

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 23 JUL 1999

WIPO PCT



EP 99/3889

S

Bescheinigung

09/701586

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue Poly(ADP-ribose)polymerase-Gene"

am 1. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 12 Q und A 01 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 1. Juni 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 08 837.3

Seller

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Neue Poly(ADP-ribose)polymerase-Gene

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) Gene und die von ihnen abgeleiteten Proteine; Antikörper mit Spezifität für die neuen Proteine; pharmazeutische und gentherapeutische Mittel, welche erfindungsgemäße Produkte enthalten; Verfahren zur analytischen Bestimmung der erfindungsgemäßen Proteine und Nukleinsäuren; Verfahren zur Identifizierung von Effektoren oder Bindungspartnern der erfindungsgemäßen Proteine; Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit solcher Effektoren sowie deren Anwendung zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen.

1966 entdeckten Chambon und Mitarbeiter ein 116 kDa Enzym, daß in den darauffolgenden Jahren näher charakterisiert wurde und heute die Namen PARP (EC 2.4.2.30) (Poly(adenosin-5'-diphospho-ribose) polymerase), PARS (Poly(adenosin-5'-diphospho-ribose) synthetase) oder ADPRT (Adenosin-5'-diphospho-ribose-transferase) trägt. Bis dato war dieses Enzym mit seiner infolge beschriebenen Aktivität einzigartig. Der Eindeutigkeit halber wird es im Folgenden mit PARP1 bezeichnet.

25

Die primäre, physiologische Funktion von PARP 1 scheint in seiner Beteiligung an einem komplexen Reparaturmechanismus zu bestehen, den Zellen zur Reparatur von DNA-Strangbrüchen entwickelt haben. Die primäre zelluläre Reaktion auf einen DNA-Strangbruch scheint dabei in der PARP1-katalysierten Synthese von Poly(ADP-ribose) aus NAD⁺ zu bestehen (vgl. De Murcia, G. et al. (1994) TIBS, 19, 172).

PARP 1 besitzt eine modular aufgebaute Molekülstruktur. Drei funktionale Hauptelemente wurden bisher identifiziert: eine N-terminale 46kDa große DNA-Bindungsdomäne; eine zentrale 22kDa Automodifikationsdomäne, an welche Poly(ADP-ribose) angehängt wird, wobei die Enzymaktivität von PARP 1 mit zunehmender Elongation abnimmt; und eine C-terminale 54 kDa große NAD⁺-Bindungsdomäne. Lediglich in PARP aus Drosophila wurde eine Leucin-Zipper-Region innerhalb der Automodifikationsdomäne festgestellt, welche auf mögliche Protein-Protein-Interaktionen hinweist. Alle bisher bekannten PARPs sind vermutlich als Homodimere aktiv.

Der hohe Organisationsgrad des Moleküls spiegelt sich wieder in der starken Konservierung der Aminosäuresequenz. So wurde für PARP 1 aus Mensch, Maus, Rind und Huhn eine 62%-ige Konservierung

- der Aminosäuresequenz festgestellt. Größere strukturelle Unterschiede bestehen zu PARP aus *Drosophila*. Die einzelnen Domänen selbst weisen wiederum Cluster mit erhöhter Konservierung auf. So enthält die DNA-Bindungsregion zwei sogenannte Zink-Finger als
- 5 Unterdomänen (umfassend Motive des Typs $CX_2CX_{28/30}HX_2C$), die an der Zn^{2+} -abhängigen Erkennung von DNA-Einzelstrangbrüchen oder einzelsträngigen DNA-Überhängen (z.B. an den Chromosomenenden, den Telomeren) beteiligt sind. Die C-terminale katalytische Domäne umfaßt einen Block von etwa 50 Aminosäuren (Reste 859-908), der un-
- 10 ter Vertebraten zu 100% konserviert ist (PARP-"Signature"). Dieser Block bindet das natürliche Substrat NAD^+ und bedingt somit die Synthese von Poly(ADP-ribose) (vgl. de Murcia, a.a.O.). Insbesondere das GX_3GKG -Motiv ist für PARPs in diesem Block charakteristisch.
- 15
- Der oben beschriebenen positiven Funktion steht eine pathologische in zahlreichen Krankheiten (Schlaganfall, Herzinfarkt, Sepsis etc.) gegenüber. PARP ist in den Zelltod infolge von Ischämien des Gehirns (Choi, D.W., (1997) *Nature Medicine*, 3, 10,
- 20 1073), des Myokards (Zingarelli, B., et al (1997), *Cardiovascular Research*, 36, 205) und auch des Auges (Lam, T.T. (1997), *Res. Comm. in Molecular Pathology and Pharmacology*, 95, 3, 241) involviert. Auch bei septischem Schock wurde eine durch Entzündungs-Mediatoren ausgelöste PARP-Aktivierung beobachtet (Szabo, C., et
- 25 al. (1997), *Journal of Clinical Investigation*, 100, 3, 723). Dabei geht eine Aktivierung von PARP mit einem starken Verbrauch an NAD^+ einher. Da für die Biosynthese von einem Mol NAD^+ vier Mole ATP verbraucht werden, nimmt die zelluläre Energieversorgung drastisch ab. Zelltod ist die Folge.
- 30
- Als PARP1-Inhibitoren werden in der oben genannten Fachliteratur Nicotinamid und 3-Aminobenzamid beschrieben. 3,4-Dihydro-5[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isochinolon ist aus Takahashi, K., et al (1997), *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 17, 1137 bekannt. Weitere Inhibitoren werden z.B. be-
- 35 schrieben in Banasik, M., et al. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 3, 1569 und Griffin, R.J., et al. (1995), *Anti-Cancer Drug Design*, 10, 507.
- 40 Als hochmolekulare Bindungspartner für humanes PARP1 ist unter anderem das Base Excision Repair (BER) Protein XRCC1 (X-ray repair cross-complementing 1) beschrieben worden, das über ein Zink-Finger-Motiv und ein BRCT (BRCA1 C-Terminus) Modul (Aminosäuren 372-524) bindet (Masson, M., et al., (1998) *Molecular and*
- 45 *Cellular Biology*, 18,6, 3563).

Aufgrund der vielfältigen physiologischen und pathologischen Funktionen von PARP stellte sich die Aufgabe, neue PARP-Homologe bereitzustellen. Die Bereitstellung von homologen PARP's wäre nämlich von besonderer Bedeutung für die Entwicklung neuer Wirk-
5 stofftargets bzw. neuer Wirkstoffe, um Diagnose und/oder Therapie von Krankheitszuständen zu verbessern, in welche PARP, PARP-Homologe oder davon abgeleitete Substanzen involviert sind.

Diese Aufgabe wurde überraschenderweise gelöst durch Bereitstel-
10 lung von PARP-Homologen, gekennzeichnet durch eine Aminosäuresequenz, die

- a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne, d. h. eine PARP-"Signature"-Sequenz mit dem charakteristischen GX₃GKG-Motiv;
und
- 15 b) insbesondere im N-terminalen Sequenzbereich, d.h. im Bereich der ersten 200, wie z.B. im Bereich der ersten 100, N-terminalen Aminosäuren, keine PARP-Zink-Finger-Sequenzmotive der allgemeinen Formel



- 20 aufweist, worin
m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen;

und die funktionalen Äquivalente davon.

25

Da die erfindungsgemäßen PARP-Moleküle insbesondere funktionale Homologe darstellen, besitzen sie natürlich außerdem eine Poly-(ADP-ribose)-synthetisierende Aktivität. Die NAD-Bindungsdomäne entspricht im Wesentlichen dieser Aktivität und ist C-termi-
30 nal lokalisiert.

Wesentliches Kennzeichen der erfindungsgemäßen PARPs ist somit das Vorhandensein einer funktionalen NAD⁺-Bindungsdomäne (PARP-Signature), welche im C-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz
35 (d.h. etwa im Bereich der letzten 400, wie z.B. der letzten 350 oder 300, C-terminalen Aminosäuren) liegt, in Kombination mit einer keine Zink-Finger-Motive aufweisenden N-terminalen Sequenz. Da die Zink-Finger-Motive in bekannten PARPs vermutlich zur Erkennung der DNA-Bruchstellen beitragen, ist anzunehmen, daß die
40 erfindungsgemäßen Proteine mit DNA nicht oder in anderer Weise wechselwirken. Mit entsprechenden biochemischen Tests konnte nachgewiesen werden, daß das erfindungsgemäße PARP2 durch "aktivierte DNA" (d.h. limitiert DNAaseI verdaute DNA) aktiviert werden kann. Daraus kann ferner geschlossen werden, daß das erfin-
45 dungsgemäße PARP2 DNA bindende Eigenschaften haben. Der Mechanismus der DNA-Bindung und Enzym-Aktivierung bei den erfindungsgemäßen PARPs ist jedoch unterschiedlich zu dem von PARP1. Dessen

DNA-Bindung und Enzym-Aktivierung wird wie erwähnt durch ein charakteristisches Zink-Finger-Motiv vermittelt. Derartige Motive sind in den erfindungsgemäßen PARPs nicht vorhanden. Vermutlich vermitteln positiv-geladene Aminosäuren im N-terminalen Bereich

5 der erfindungsgemäßen PARPs diese Eigenschaften. Da die "aktivierte DNA" (d.h. zum Beispiel DNA, die limitiert mit DNAaseI behandelt wurde) eine Vielzahl von Defekten aufweist (Einzelstrangbrüche, Einzelstranglücken, Einzelstrangüberhänge, Doppelstrangbrüche etc.) ist es möglich, daß PARP1 und die erfindungsgemäßen

10 PARPs zwar durch die selbe "aktivierte DNA" aktiviert werden, jedoch durch eine andere Subpopulation von Defekten (z. B. Einzelstrangbrüche).

Die funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne (d.h. katalytische Domäne)

15 bindet das Substrat für die Poly-ADP-ribose-Synthese. In Übereinstimmung mit bekannten PARPs ist insbesondere das Sequenzmotiv GX¹X²X³GKG, worin G für Glycin steht, K für Lysin steht und X¹, X² und X³ unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen, zu finden. Wie jedoch ein Vergleich der Aminosäuresequenzen

20 der NAD⁺-Bindungsdomänen erfindungsgemäßer PARP-Moleküle mit bisher bekanntem humanem PARP1 überraschenderweise zeigt, weichen die erfindungsgemäßen Sequenzen von der bekannten Sequenz für die NAD⁺-Bindungsdomäne deutlich ab.

25 Einer erfindungsgemäß bevorzugten Gruppe von PARP-Molekülen ist folgendes allgemeines Sequenzmotiv in der katalytischen Domäne vorzugsweise gemeinsam:

PX_n(S/T)GX₃GKGIYFA, insbesondere

30 (S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFA, vorzugsweise
LLWHG(S/T)X₇IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFAX₃SKSAXY

worin (S/T) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit S oder T beschreibt, (I/V) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit I oder V beschreibt und n für einen ganzzahligen Wert von 1 bis 5 steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen. Letztes Motiv wird auch

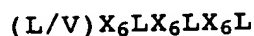
35 als "PARP-Signature" Motiv bezeichnet.

40 Die Automodifikationsdomäne ist in den erfindungsgemäßen PARPs vorzugsweise ebenfalls ausgebildet. Sie kann etwa im Bereich von etwa 100 bis 200 Aminosäuren vor dem N-terminalen Ende der NAD⁺-Bindungsdomäne liegen.

5

Erfindungsgemäße PARP-Homologe können außerdem N-terminal zur NAD⁺-Bindungsdomäne (d.h. etwa 30 bis etwa 80 Aminosäuren näher am N-Terminus) ein Leucin-Zipper-artiges Sequenzmotiv der allgemeinen Formel

5



umfassen,
 worin (L/V) für die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit L oder V steht und die Reste X unabhängig voneinander für
 10 eine beliebige Aminosäure stehen. Die erfindungsgemäß beobachteten Leucin-Zipper-Motive unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lage deutlich von den für PARP aus Drosophila beschriebenen. Leucin-Zipper können zu Homodimeren (zwei PARP-Moleküle) oder Heterodimeren (ein PARP-Molekül mit einem davon verschiedenen Bindungspartner) führen.

Die erfindungsgemäßen PARP-Homologen umfassen vorzugsweise außerdem N-terminal zum oben genannten Leucin-Zipper-artigen Sequenzmotiv, d.h. etwa 10 bis 250 Aminosäurereste näher am N-Terminus,
 20 wenigstens ein weiteres der folgenden Teilsequenz-Motive:

	LX ₉ NX ₂ YX ₂ QLLX(D/E)X _b WGRVG,	(Motiv 1)
	AX ₃ FXKX ₄ KTXNXWX ₅ FX ₃ PXK,	(Motiv 2)
	QXL(I/L)X ₂ IX ₉ MX ₁₀ PLGKLX ₃ QIX ₆ L,	(Motiv 3)
25	FYTXIPHXF ₃ GX ₃ PP,	(Motiv 4) und
	KX ₃ LX ₂ LXDIEAX ₂ L	(Motiv 5),

worin (D/E) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit D oder E beschreibt, (I/L) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit I oder L beschreibt, b für den ganzzahligen Wert 10 oder 11 steht und die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure stehen. Am meisten bevorzugt sind diese Motive 1 bis 5 in der genannten Reihenfolge gleichzeitig vorhanden, wobei Motiv 1 dem N-Terminus am nächsten liegt.

35

Auf das oben genannte PARP-Signature Motiv folgt in den erfindungsgemäßen Proteinen wenigstens ein weiteres der folgenden Motive:

40	GX ₃ LXEVALG	(Motiv 6)
	GX ₂ SX ₄ GX ₃ PX _a LXGX ₂ V	(Motiv 7) und
	E(Y/F)X ₂ YX ₃ QX ₄ YLL	(Motiv 8)

worin (Y/F) die alternative Besetzung dieser Sequenzposition mit
 45 Y oder F beschreibt, a gleich 7 bis 9 und X jeweils für eine beliebige Aminosäure steht. Am bevorzugtesten sind die drei C-ter-

minalen Motive gleichzeitig und in der genannten Reihenfolge ausgebildet, wobei Motiv 8 dem C-Terminus am nächsten liegt.

Ein bevorzugter Aufbau einer erfindungsgemäßen PARP-Struktur kann
5 schematisch wie folgt beschrieben werden:

Motive 1 bis 5/PARP-Signature/Motive 6 bis 8 oder
Motive 1 bis 5/Leucin-Zipper/PARP-Signature/Motive 6 bis 8

- 10 wobei zwischen den Einzelmotiven weiterer Aminosäurereste, wie z.B. bis zu 40, und am N-Terminus und/oder am C-Terminus weitere Aminosäurereste, wie z.B. bis zu 80, angeordnet sein können.

- Erfindungsgemäß besonders bevorzugte PARP-Homologe sind die Pro-
15 teine humanPARP2, humanPARP3, mausPARP3 und die funktionalen Äquivalente davon. Das als humanPARP2 bezeichnete Proteine umfaßt 570 Aminosäuren (vgl. SEQ ID NO:2). Das als humanPARP3 bezeichnete Protein existiert möglicherweise in zwei Formen. Typ 1 umfaßt dabei 533 Aminosäuren (SEQ ID NO:4) und Typ 2 umfaßt 540
20 Aminosäuren (SEQ ID NO:6). Die Formen können sich durch unterschiedliche Initiation der Translation ergeben. Das als maus PARP3 bezeichnete Proteine existiert in zwei Formen, die sich durch eine Deletion von 5 Aminosäuren (15 bp) voneinander unterscheiden. Typ 1 umfaßt dabei 533 Aminosäuren (SEQ ID NO:8), Typ 2
25 umfaßt 528 Aminosäuren (SEQ ID NO:10).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Bindungspartner für die erfindungsgemäßen PARP-Homologen. Diese Bindungspartner sind vorzugsweise ausgewählt unter

- 30 a) Antikörpern und Fragmenten, wie z.B. Fv, Fab, (Fab)'₂, davon
b) proteinartigen Verbindungen, welche, z.B. über die obige Leucin-Zipper-Region oder einen anderen Sequenzabschnitt, mit PARP wechselwirken, und
c) niedermolekularen Effektoren, welche eine biologische PARP-
35 Funktion, wie z.B. die katalytische PARP-Aktivität, d.h. die NAD⁺-verbrauchende ADP-Ribosylierung, oder die Bindung an ein Aktivatorprotein oder an DNA modulieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuren, um-
40 fassend

- a) eine, für wenigstens ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes kodierende, Nukleotidsequenz oder die komplementäre Nukleotidsequenz davon;
b) eine Nukleotidsequenz, die, vorzugsweise unter stringenten
45 Bedingungen mit einer Sequenz gemäß a) hybridisiert; oder

- c) Nukleotidsequenzen, die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes von den in a) und b) definierten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind.

5 Insbesondere umfassen erfindungsgemäß geeignete Nukleinsäuren wenigstens eine der Teilsequenzen welche für die oben genannten Aminosäuresequenzmotive kodieren.

Erfindungsgemäß bevorzugte Nukleinsäuren umfassen Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 und 3, und insbesondere für erfindungsgemäße PARP-Homologe charakteristische Teilsequenzen daraus, wie z.B. Nukleotidsequenzen, umfassend

- a) die Nukleotide +3 bis + 1715 gemäß SEQ ID NO:1;
15 b) die Nukleotide +242 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:3;
c) die Nukleotide +221 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:5;
d) die Nukleotide +112 bis +1710 gemäß SEQ ID NO:7; oder
e) die Nukleotide + 1 bis + 1584 gemäß SEQ ID NO:9

20 oder Teilsequenzen von a), b), c), d) und e), welche für oben genannte charakteristische Aminosäuresequenzmotive der erfindungsgemäßen PARP-Homologen kodieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfaßt Expressionskassetten, welche unter genetischer Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen wenigstens eine der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen enthalten. Diese sind zur Herstellung erfindungsgemäßer rekombinanter Vektoren, wie z.B. von viralen Vektoren oder Plasmiden brauchbar, welche wenigstens eine erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten.

Erfindungsgemäße rekombinante Mikroorganismen sind mit wenigstens einem der oben genannten Vektoren transformiert.

35 Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Säuger, transfiziert mit einem erfindungsgemäßen Vektor.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein, homogen oder heterogen durchführbares, in vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren, das dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylierbares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, umfassend
45 a1) ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes;
a2) einen PARP-Aktivator; und
a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;

- b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und
- c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder quantitativ bestimmt.

5 Vorzugsweise wird das Nachweisverfahren so durch geführt, dass man das PARP-Homologe mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet, vorinkubiert, wie z.B. etwa 1 bis 30 Minuten, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt.

10

Nach Aktivierung durch DNS mit Einzelstrangbrüchen (erfindungsgemäß bezeichnet als "aktivierte DNS") poly-ADP-ribosyliert PARP eine Vielzahl nukleärer Proteine in Gegenwart von NAD. Zu diesen Proteinen zählt zum einen PARP selber, aber auch Histone etc.

15

Das bei den Nachweisverfahren vorzugsweise verwendete Poly-ADP-ribosylierbare Target ist ein Histon-Protein in seiner nativen Form oder ein davon abgeleitetes Poly-ADP-ribosylierbares Äquivalent. Beispielhaft wurde eine Histonpräparation der Firma Sigma

20 verwendet (SIGMA, Katalog-Nr. H-7755; Histone Typ II-as aus Kalbsthymus, Luck, J. M., et al., J. Biol. Chem., 233, 1407 (1958), Satake K., et al., J. Biol. Chem, 235, 2801 (1960)). Im Prinzip können alle Arten von Proteinen oder Teile von diesen verwendet werden, die einer Poly-ADP-ribosylierung durch PARP zugänglich
25 sind. Dies sind bevorzugterweise nukleäre Proteine, z. B. Histone, DNA-Polymerase, Telomerase oder PARP selber. Auch synthetische Peptide, die von den entsprechenden Proteinen abgeleitet sind, können als Target fungieren.

30 Es können im erfindungsgemäßen ELISA Assay Histonmengen im Bereich von etwa 0,1 µg/well bis etwa 100 µg/well, vorzugsweise etwa 1 µg/well bis etwa 10 µg/well, verwendet werden. Die PARP-Enzymmengen liegen in einem Bereich von etwa 0,2 pMol/well bis etwa 2 nMol/well, vorzugsweise von etwa 2 pMol/well bis etwa 200 pMol/
35 well, wobei der Reaktionsansatz jeweils 100 µl/well ausmacht. Reduzierungen auf kleinere Wells und entsprechend kleinere Reaktionsvolumina sind möglich.

Beim erfindungsgemäßen HTRF Assay werden identische PARP-Mengen
40 eingesetzt, die Menge an Histon oder modifizierten Histonen liegt im Bereich von etwa 2 ng/well bis etwa 25 µg/well, vorzugsweise etwa 25 ng/well bis etwa 2,5 µg/well, wobei der Reaktionsansatz jeweils 50 µl/well ausmacht. Reduzierungen auf kleinere Wells und entsprechend kleinere Reaktionsvolumina sind möglich.

45

Der erfindungsgemäß verwendete PARP-Aktivator ist vorzugsweise aktivierte DNA.

- Als Aktivator können diverse Typen geschädigter DNA fungieren.
- 5 DNA-Schädigungen können durch Verdau mit DNAasen oder anderen DNA-modifizierenden Enzymen (z. B. Restriktionsendonukleasen), durch Bestrahlung oder andere physikalische Methoden oder chemische Behandlung der DNA erzielt werden. Ferner ist es möglich, mittels synthetischer Oligonukleotide die Situation einer DNA-
- 10 Schädigung gezielt zu simulieren. In den beispielhaft angegebenen Assays wurde aktivierte DNA aus Kalbsthymus eingesetzt (SIGMA, Produkt-Nr. D4522, CAS: 91080-16-9, hergestellt nach der Methode von Aposhian und Kornberg unter Verwendung von Kalbsthymus-DNA (SIGMA D-1501) und Deoxyribonuklease Typ I (D-4263). Aposhian H.
- 15 V. und Kornberg A., J. Biol. Chem., 237, 519 (1962)). Verwendet wurde die aktivierte DNA in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1000 µg/ml, vorzugsweise von 1 bis 100 µg/ml im Reaktionsschritt.
- 20 Die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion wird in den erfindungsgemäßen Verfahren durch Zugabe von NAD⁺ gestartet. Die Konzentrationen von NAD lagen in einem Bereich von etwa 0,1 µM bis etwa 10 mM, bevorzugt in einem Bereich von etwa 10 µM bis etwa 1 mM.
- 25 Gemäß der heterogen durchführbaren Variante obigen Verfahrens wird die Poly-ADP-Ribosylierung des geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt. Dazu trennt man das Reaktionsgemisch vom geträgerten Target ab, wäscht und inkubiert mit dem Antikörper. Dieser Antikörper kann selbst markiert sein. Vor-
- 30 zugsweise verwendet man jedoch zum Nachweis von gebundenem Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper einen markierten sekundären Antikörper, oder ein entsprechendes markiertes Antikörperfragment. Geeignete Markierungen sind z.B. Radiomarkierung, Chromophor- oder Fluorophormarkierung, Biotinylierung, Chemilumineszenzmarkierung,
- 35 Markierung mit paramagnetischem Metall, oder insbesondere Enzymmarkierungen, wie z.B. mit Meerrettich-Peroxidase. Entsprechende Nachweistechiken sind dem Fachmann allgemein bekannt.

- Gemäß der homogen durchführbaren Variante obigen Verfahrens ist
- 40 das nichtgeträgerte Target mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert. Bevorzugt verwendet man dazu als Target biotinyliertes Histone, wobei das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin an die Biotingruppen des Histons gekoppelt ist. Als Akzeptor-Fluorophor sind insbesondere geeignet Phycobiliproteine (z. B.
- 45 Phycocyanine, Phycoerythrine), z. B. R-Phycocyanin (R-PC), Allophycocyanin (APC), R-Phycoerythrin (R-PE), C-Phycocyanin (C-PC), B-Phycoerythrin (B-PE) oder ihre Kombinationen untereinander oder

- mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie Cy5, Cy7 oder Texas Red (Tandem system) (Thammapalerd, N. et al., Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health, 27(2): 297-303 (1996); Kronick, M. N. et al., Clinical Chemistry, 29(9), 1582-1586 (1986); Hicks, J. M., Human Pathology, 15(2), 112-116 (1984)). Bei dem in den Beispielen verwendeten Farbstoff XL665 handelt es sich um ein quervernetztes Allophycocyanin (Glazer, A. N., Rev. Microbiol., 36, 173-198 (1982); Kronick, M. N., J. Imm. Meth., 92, 1-13 (1986); MacColl, R. et al., Phycobiliproteins, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987); MacColl, R. et al., Arch. Biochem. Biophys., 208(1), 42-48 (1981)).

- Außerdem ist bevorzugt, bei dem homogenen Verfahren die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper zu bestimmen, der mit einem Donor-Fluorophor markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist, wenn Donor und Akzeptor durch Bindung des markierten Antikörpers an das Poly-ADP-ribosylierte Histon in räumliche Nähe gelangen. Vorzugsweise verwendete man ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor für den Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper.

- Neben dem verwendeten Europium-Kryptat können auch weitere Verbindungen als potentielle Donor-Moleküle auftreten. Hierbei kann zum einen der Kryptatkäfig modifiziert werden. Auch Austausch des Europiums gegen andere Seltenerdmetalle, wie z. B. Terbium, sind denkbar. Entscheidend ist eine lange Lebensdauer der Fluoreszenz, die die Zeitverzögerung garantiert (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622).

- Die oben beschriebenen Nachweisverfahren basieren auf dem Prinzip, daß die Aktivität von PARP mit der Menge der an den Histonen gebildeten ADP-ribose-Polymeren korreliert. Der hier beschriebene Assay ermöglicht die Quantifizierung der ADP-ribose Polymere mittels spezifischer Antikörper in Form eines ELISA- und eines HTRF- (homogenous time-resolved fluorescence; homogene zeit-aufgelöste Fluoreszenz) Assays. Konkrete Ausführungsformen dieser beiden Tests sind in den folgenden Ausführungsbeispielen näher beschrieben.

- Das entwickelte HTRF (Homogenous Time-Resolved Fluorescence)-Testsystem mißt die Bildung von Poly-(ADP-Ribose) an Histonen mittels spezifischer Antikörper. Im Unterschied zum ELISA wird dieser Test in homogener Phase ohne Separations- und Waschschritte durchgeführt. Dies ermöglicht einen höheren Probendurchsatz und eine geringere Fehleranfälligkeit. HTRF basiert auf dem "Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer" (FRET) zwischen zwei Fluorophoren.

rophoren. In einem FRET Assay kann ein angeregtes Donor-Fluorophor seine Energie auf ein Akzeptor-Fluorophor übertragen, wenn sich die beiden in einer räumlichen Nähe befinden. In der HTRF-Technologie ist das Donor-Fluorophor ein Europium-Kryptat [(Eu)K] und der Akzeptor ist XL665, ein stabilisiertes Allophycocyanin. Das Europium-Kryptat basiert auf Arbeiten von Jean Marie Lehn (Strasbourg) (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39/2, 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622).

- 10 In einem homogenen Assay sind alle Komponenten auch während der Messung anwesend. Während dies Vorteile bei der Assaydurchführung bringt (Schnelligkeit, Aufwand), müssen Störungen durch Assaykomponenten (Eigenfluoreszenz, Quenching durch Farbstoffe etc.) ausgeschlossen werden. HTRF schließt diese Störungen durch eine
- 15 zeitverzögerte Messung bei zwei Wellenlängen (665nm, 620nm) aus. Die HTRF-Fluoreszenz hat eine sehr lange Abklingzeit und kann daher zeitverzögert gemessen werden. Jegliche interferierende, kurzlebige Hintergrundfluoreszenz (z. B. durch Assaykomponenten oder Inhibitoren der Substanzbank) stört hier nicht mehr. Darüberhinaus wird permanent bei zwei Wellenlängen gemessen, um
- 20 "Quench-Effekte" farbiger Substanzen zu kompensieren. HTRF Assays sind z.B. im 96- or 384-well Mikrotiterplattenformat realisierbar und werden mit einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Packard Instruments) ausgewertet.

- 25 Erfindungsgemäß werden außerdem die folgenden in vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für PARP, insbesondere für ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes, bereitgestellt.

- 30 Eine erste Variante wird so durchgeführt, daß man
- a1) wenigstens ein PARP-Homologes an einem Träger immobilisiert;
 - b1) das immobilisierte PARP-Homologe mit einem Analyten in Kontakt bringt, in welchem man wenigstens einen Bindungspartner vermutet; und
- 35 c1) an das immobilisierte PARP-Homologe gebundene Bestandteile des Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, bestimmt.

Gemäß einer zweiten Variante wird

- 40 a2) ein Analyt, welcher wenigstens einen möglichen Bindungspartner für das PARP-Homologe enthält, an einem Träger immobilisiert;
- b2) der immobilisierte Analyt mit wenigstens einem PARP-Homologen in Kontakt gebracht, für welches man einen Bindungspartner
- 45 sucht; und

c3) der immobilisierte Analyt wird, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, auf die Bindung des PARP-Homologen untersucht.

5 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung einer PARP-Homologe kodierenden Nukleinsäure, gekennzeichnet durch

10 a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten Menge einer exogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäure (z.B. mit einer Länge von etwa 20 bis 500 Basen oder länger), Hybridisierung, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, Bestimmung der hybridisierenden Nukleinsäuren und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard; oder

15 b) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten Menge von Oligonucleotid-Primerpaaren mit Spezifität für ein PARP-Homologes kodierende Nukleinsäure, Amplifizierung der Nukleinsäure, Bestimmung des Amplifikationsprodukts und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung eines erfindungsgemäßen PARP-Homologen, gekennzeichnet durch

25 a) Inkubation einer biologischen Probe mit wenigstens einem für ein PARP-Homologes spezifischen Bindungspartner,
b) Nachweis des Bindungspartner/PARP-Komplexes und gegebenenfalls
c) Vergleich des Ergebnisses mit einem Standard.

30 Vorzugsweise ist hierbei der Bindungspartner ein Anti-PARP-Antikörper oder ein bindendes Fragment davon, der gegebenenfalls eine detektierbare Markierung trägt.

Die erfindungsgemäßen Bestimmungsverfahren für PARP, insbesondere
35 für PARP-Homologe und für die kodierenden Nukleinsäuresequenzen davon eignen sich vorteilhafterweise zur Diagnostizierung von Sepsis- oder Ischämie-bedingten Gewebeschädigungen, insbesondere von Schlaganfällen, Myokard-Infarkten oder septischen Schocks.

40 Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit von PARP-Effektoren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

45 a) ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen PARP-Aktivität enthält; den Effektor gegebenenfalls wieder abtrennt; und

- b) die Aktivität des PARP-Homologen, gegebenenfalls nach Zugabe von Substraten oder Cosubstraten, bestimmt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft gentherapeutisches Mittel, die in einem gentherapeutisch akzeptablen Träger ein Nukleinsäurekonstrukt enthalten, das

- a) eine Antisense-Nukleinsäure gegen eine kodierende Nukleinsäure gemäß der Erfindung; oder
b) ein Ribozym gegen eine nicht-kodierende erfindungsgemäße Nukleinsäure umfasst; oder
c) für einen spezifischen PARP-Inhibitor kodiert.

Weiterhin betrifft die Erfindung pharmazeutische Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger wenigstens ein erfindungsgemäßes PARP-Protein, wenigstens einen erfindungsgemäßen PARP-Bindungspartner oder wenigstens eine erfindungsgemäße kodierende Nukleotidsequenz.

- Schließlich betrifft die Erfindung die Verwendung von Bindungspartnern eines PARP-Homologen zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, an deren Entstehung und/oder Verlauf wenigstens ein PARP-Protein, insbesondere ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes, oder ein davon abgeleitetes Polypeptid beteiligt sind.
- Der verwendete Bindungspartner kann beispielsweise ein niedermolekularer Bindungspartner sein, dessen Molekulargewicht z. B. kleiner als etwa 2000 Dalton oder kleiner als etwa 1000 Dalton sein kann.
- Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung von PARP-Bindungspartnern zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, die durch eine Energiedefizienz vermittelt werden. Eine Energiedefizienz im Sinne vorliegender Erfindung ist insbesondere eine zelluläre Energiedefizienz, welche bei dem erkrankten Patienten systemisch oder in einzelnen Körperbereichen, Organen oder Organbereichen, oder Geweben oder Gewebebereichen zu beobachten ist. Diese ist durch eine über den physiologischen Schwankungsbereich des NAD- und/oder ATP-Spiegels hinausgehende NAD- und/oder ATP-Depletion gekennzeichnet, welche vorzugsweise durch ein Protein mit PARP-Aktivität, insbesondere ein erfindungsgemäßes PARP-Homologes, oder ein davon abgeleitetes Polypeptid, vermittelt wird.

Gegenstand der Erfindung ist insbesondere die Verwendung eines PARP-Bindungspartners gemäß obiger Definition zur Diagnose oder Therapie (akut oder prophylaktisch) von Energiedefizienz-vermittelten Krankheitszuständen, ausgewählt unter neurodegenerativen

Erkrankungen, oder Sepsis- oder Ischämie-bedingten Gewebeschädigungen, insbesondere von neurotoxischen Störungen, Schlaganfällen, Myokard-Infarkten, Schädigungen, die während oder nach der medikamentösen Infarktlyse (B. mit TPA, Reteplase oder mechanisch mit Laser oder Rotablator) und von Mikroinfarkten während und nach Herzklappenersatz, Aneurismenresektionen und Herztransplantationen, Kopf- und Rückenmarkstraumen, Infarkten der Niere (akutes Nierenversagen, akute Niereninsuffizienz oder Schädigungen während und nach einer Nierentransplantation), Infarkten der Leber (Leberversagen, Schädigungen während oder nach einer Lebertransplantation), peripheren Neuropathien, AIDS Demenz, septischen Schocks, Diabetes, Trauma (Schädel-Hirn-Trauma), Massenblutung, Subarachnoidal-Blutungen, Alzheimerkrankheit, multipler Infarkt-Dementia, Huntington-Erkrankung, Epilepsie, Parkinsonscher Krankheit, amyotropher lateraler Sklerose, Nierenversagen, darüber hinaus bei der Chemotherapie von Tumoren und Verhinderung von Metastasierung sowie zur Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, z. B. der rheumatischen Arthritis; ferner bei der Behandlung einer Revaskularisation kritisch verengter Koronararterien und kritisch verengter peripherer Arterien, z. B. Beinarterien.

Nichtlimitierende Beispiele für Tumoren sind Leukämie, Glioblastome, Lymphome, Melanome, Mamma- und Cervicalkarzinome etc.

25

Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher beschrieben. Dabei zeigt:

Figur 1 ein Sequenz-Alignment von menschlichem PARP (humanPARP1) und zwei erfindungsgemäß bevorzugte PARPs (humanPARP2, humanPARP3, murinPARP3). Sequenzübereinstimmungen zwischen humanPARP1 und humanPARP2, humanPARP3 bzw. murinPARP3 sind umrahmt dargestellt. Die Majoritätssequenz ist über dem Alignment angegeben. Die Zink-Finger Motive von humanPARP1 befinden sich in den Sequenzabschnitten entsprechend den Amnosäureresten 21 bis 56 und 125 bis 162;

Figur 2 Northern Blots mit unterschiedlichen menschlichen Geweben zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP2 und PARP3-Moleküle. Bahn 1: Gehirn; Bahn 2: Herz; Bahn 3: Skelettmuskel; Bahn 4: Dickdarm; Bahn 5: Thymus; Bahn 6: Milz; Bahn 7: Niere; Bahn 8: Leber; Bahn 9: Dünndarm; Bahn 10: Plazenta; Bahn 11: Lunge; Bahn 12: Periphere Blutleukozyten; die jeweilige Lage der Größenstandards (kb) ist angegeben.

45

Figur 3 einen Northern Blot mit weiteren unterschiedlichen menschlichen Geweben zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP3-Moleküls. Bahn 1: Herz; Bahn 2: Gehirn; Bahn 3: Plazenta; Bahn 4: Lunge; Bahn 5: Leber; Bahn 6: Skelettmuskel; Bahn 7: Niere; Bahn 8: Pankreas; die jeweilige Lage der Größenstandards (kD) ist angegeben.

Figur 4 einen Western Blot mit unterschiedlichen menschlichen Geweben zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP3-Moleküls auf Protein Ebene. Bahn 1: Herz; Bahn 2: Lunge; Bahn 3: Leber; Bahn 4: Milz; Bahn 5: Niere; Bahn 6: Dickdarm; Bahn 7: Muskel; Bahn 8: Hirn; die jeweilige Lage der Größenstandards (kD) ist angegeben

Figur 5 einen Western Blot mit unterschiedlichen menschlichen Geweben zur Veranschaulichung der Gewebeverteilung des erfindungsgemäßen PARP3-Moleküls. Bahn 1: Frontaler Cortex; Bahn 2: Posterior Cortex; Bahn 3: Cerebellum; Bahn 4: Hippocampus; Bahn 5: Olfactory Bulb; Bahn 6: Striatum; Bahn 7: Thalamus; Bahn 8: Midbrain; Bahn 9: Entorhinal Cortex; Bahn 10: Pons; Bahn 11: Medulla; Bahn 12: Rückenmark.

Figur 6 eine schematische Darstellung des PARP-Assays (ELISA)

Figur 7 eine schematische Darstellung des PARP-Assays (HTRF)

Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

PARP-Homologe und funktionale Äquivalente

Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, werden im Rahmen der vorliegenden Beschreibung Aminosäuresequenzen beginnend mit dem N-Terminus angegeben. Wird der Ein-Buchstaben-Code für Aminosäuren verwendet, so steht G für Glycin, A für Alanin, V für Valin, L für Leucin, I für Isoleucin, S für Serin, T für Threonin, D für Asparaginsäure, N für Asparagin, E für Glutaminsäure, Q für Glutamin, W für Tryptophan, H für Histidin, R für Arginin, P für Prolin, K für Lysin, Y für Tyrosin, F für Phenylalanin, C für Cystein und M für Methionin.

Die vorliegende Erfindung ist nicht auf die oben konkret beschriebenen PARP-Homologen beschränkt. Vielmehr werden auch solche Homologen erfaßt, welche funktionale Äquivalente davon darstellen. Funktionale Äquivalente umfassen sowohl natürliche, wie z.B. Spezies-spezifische oder Organ-spezifische, als auch künstlich erzeugte Varianten der hierin konkret beschriebenen Pro-

teine. Erfindungsgemäße funktionale Äquivalente unterscheiden sich durch Addition, Substitution, Inversion, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten von humanPARP2 (SEQ ID NO:2), humanPARP3 (SEQ ID NO: 4 und 6) und mausPARP3 (SEQ ID NO: 8 und 10), wobei wenigstens noch die NAD-Bindungsfunktion des Proteins, vermittelt durch eine funktionale katalytische C-terminale Domäne, erhalten bleibt. Ebenso sollte vorzugsweise die Poly(ADP-ribose)-erzeugende katalytische Aktivität erhalten bleiben. Funktionale Äquivalente umfassen gegebenenfalls auch solche Varianten, in denen die Leucin-Zipper-ähnliche Region im wesentlichen erhalten bleibt.

Dabei können beispielsweise, ausgehend von der Sequenz für humanPARP2 oder humanPARP3 bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise können Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die derart gegenüber der humanPARP2- oder humanPARP3-Sequenz veränderten Proteine besitzen wenigstens 60 %, bevorzugt wenigstens 75 %, ganz besonders bevorzugt wenigstens 85 % Homologie zur Ausgangssequenz, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Folgende Homologien wurden auf Aminosäureebene bzw. DNA-Ebene zwischen humanPARP1, 2 und 3 bestimmt (FastA-Programm, Pearson und Lipman, a.a.O.):

Aminosäure-Homologien:

	Prozent Identität	Prozent Identität in PARP-Signature
PARP1/PARP2	41,97% (517)	86% (50)
PARP1/PARP3	33,81% (565)	53,1% (49)
PARP2/PARP3	35,20% (537)	53,1% (49)

Zahlen in Klammern geben die Anzahl der überlappenden Aminosäuren an.

DNA-Homologien:

	Prozent Identität im ORF	Prozent Identität in PARP-Signature
5 PARP1/PARP2	60,81% (467)	77,85% (149)
PARP1/PARP3	58,81% (420)	59,02% (61)
PARP2/PARP3	60,22% (269)	86,36% (22)

10 Zahlen in Klammern geben die Anzahl der überlappenden Nukleotide an.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide lassen sich aufgrund der hohen Ähnlichkeit im Bereich der katalytischen Domäne als homologe Poly(ADP-ribose)polymerasen klassifizieren.

15

Erfindungswesentlich ist außerdem, daß die neuen PARP-Homologen keine herkömmlichen Zink-Finger Motive aufweisen. Das bedeutet, daß diese Enzyme nicht notwendigerweise oder in einer von PARP1 ver hindernden Weise in die DNA-Reparatur involviert ist, wohl
20 aber noch ihren pathologischen Mechanismus (NAD⁺-Verbrauch und somit Energieverbrauch durch ATP-Konsum) ausüben können. Die starke Proteinexpression vor allem von PARP3, die im Western-Blot zu beobachten ist, läßt eine bedeutende Rolle im NAD-Verbrauch vermuten. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung. Potentielle neue Inhibitoren gegen die erfindungsgemäßen Polymerasen können also die pathologischen Funktionen hemmen, ohne negative Effekte auf die gewünschten physiologischen Eigenschaften zu haben. Mit Inhibitoren gegen die bislang bekannte PARPs war dies nicht möglich, da auch immer die DNA-Reparatur-
30 funktion mitinhibiert wurde. Die potentiell mutagene Wirkung bekannter PARP-Inhibitoren ist somit leicht verständlich. Ferner ist es denkbar, PARP-Inhibitoren so zu gestalten, daß sie mit hoher Affinität alle PARP-Homologen effektiv inhibieren. In diesem Fall ist gegebenenfalls eine potenzierte Wirkung denkbar.

35

Das erfindungsgemäß bevorzugte PARP-Homologe gemäß SEQ ID NO:2 (human PARP2) läßt sich vorteilhafterweise aus dem menschlichen Hirn, Herz, skelettmuskel, Niere und Leber isolieren. In anderen Geweben oder Organen ist humanPARP2 deutlich schwächer expri-
40 miert.

Das erfindungsgemäß bevorzugte PARP-Homologe gemäß SEQ ID NO: 4 und 6 (humanPARP3) läßt sich vorteilhafterweise aus dem menschlichen Hirn (hier sehr spezifisch aus dem Hippocampus), Herz, Ske-
45 lettmuskel, Leber oder Niere isolieren. In anderen Geweben oder

Organen, wie Muskel oder Leber, ist humanPARP3 deutlich schwächer exprimiert.

Der mit der Proteinisolierung vertraute Fachmann wird zur Gewinnung erfindungsgemäßer natürlicher PARPs aus Geweben oder erfindungsgemäßer rekombinant hergestellter PARPs aus Zellkulturen die dazu jeweils am geeignetste Kombination von präparativen Verfahrensmaßnahmen ergreifen. Geeignete präparative Standardmethoden sind zum Beispiel beschrieben in Cooper, T.G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R. Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem PARP2- und PARP3-Homologe, welche zwar aus anderen eukaryotischen Spezies, d.h. Evvertebraten (Invertebraten) oder Vertebraten, insbesondere anderen Säugern, wie z.B. Maus, Ratte, Katze, Hund, Schwein, Schaf, Rind, Pferd, oder Affe oder aus anderen Organen, wie z.B. Myokard, isolierbar sind, aber die wesentlichen, von den erfindungsgemäßen PARPs vorgegebenen strukturellen und funktionellen Eigenschaften besitzen.

Insbesondere das aus menschlichem Hirn isolierbare humanPARP2 und dessen funktionale Äquivalente sind bevorzugte Agenzien für die Entwicklung von Inhibitoren gegen Schlaganfall. Es kann nämlich angenommen werden, daß die Wirkstoffentwicklung, basierend auf PARP2 als Indikator, die Entwicklung von Inhibitoren ermöglicht, welche für die Anwendung an menschlichem Gehirn optimiert sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auf Basis von PARP2 entwickelte Inhibitoren auch zur Therapierung PARP-vermittelter pathologischer Zustände anderer Organe einsetzbar sind. Anhand der Gewebeverteilung der erfindungsgemäßen Proteine sind vor allem Indikationen von Interesse, die auf ischämischen Zuständen entsprechender Organe beruhen (Ischämie der Hirns (Schlaganfall), der Herzens (Herzinfarkt), Schädigungen, die während oder nach der Infarktlyse (z. B. mit TPA, Reteplase oder mechanisch mit Laser oder Rotoblator) und von Mikroinfarkten während und nach Herzklappenersatz, Aneurysmenresektionen und Herztransplantationen, der Niere (akuten Nierenversagen, akute Niereninsuffizienz oder Schädigungen während und nach einer Nierentransplantation), Schädigung der Leber oder der Skelettmuskulatur). Ferner sind Behandlung und Prophylaxe von neurodegenerativen Erkrankungen denkbar, die nach Ischämie, Trauma (Schädel-Hirn-Trauma), Massenblutung, Subarachnoidal-Blutungen und Schlaganfall auftreten, sowie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie multipler Infarkt-Demen-tia, Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und Epilepsien, insbesondere von generalisierten epileptischen Anfällen, wie z. B. Petit mal, und tonisch-clonischen Anfällen und partiell

H

2005.99

19

epileptischen Anfällen, wie Temporal Lope, und komplex-partiellen Anfällen. Ferner können besagte Proteine relevant sein bei der Behandlung einer Revaskularisation kritisch verengter Koronararterien und kritisch verengter peripherer Arterien, z. B. Beinarterien. Darüber hinaus können besagte Proteine eine Rolle spielen bei der Chemotherapie von Tumoren und bei der Verhinderung von Metastasierungen sowie bei der Behandlung von Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen, z. B. der rheumatischen Arthritis. Weitere pathologische Zustände dieser und anderer Organe sind denkbar.

Ähnlich wie PARP1 werden auch PARP2 und 3 durch geschädigte DNA, wenn auch durch einen vermutlich anderen Mechanismus aktiviert. Eine Bedeutung in der DNA-Reparatur ist denkbar. Die Blockade der erfingungsgemäßen PARPs würde auch in Indikationen, wie Krebs, von Nutzen sein (z.B. in der Radiosensitisierung von Tumorpationen).

Eine weitere wesentliche biologische Eigenschaft von erfingungsgemäßen PARPs und deren funktionalen Äquivalenten ist in deren Befähigung zur Bindung eines Interaktionspartners zu sehen. Im Unterschied zur bislang bekannten PARPs aus höheren Eukaryoten, wie insbesondere Säugern, verfügen humanPARP2 und 3 über potentielle sogenannte Leucin-Zipper-Motive. Dies ist ein typisches Motiv für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Diese Motive erlauben möglicherweise eine Modulation der PARP-Aktivität durch einen Interaktionspartner. Somit liefert auch dieses zusätzliche Strukturelement einen möglichen Ansatzpunkt für die Entwicklung von PARP-Effektoren, wie z.B. Inhibitoren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind somit Proteine, die mit PARP2 und/oder 3 wechselwirken, bevorzugt solche, die ihre Aktivierung oder Inaktivierung bewirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind auch Proteine, die noch die oben genannte Ligandenbindungsaktivität aufweisen und die ausgehend von den konkret offenbarten Aminosäuresequenzen durch gezielte Veränderungen herstellbar sind.

Ausgehend von der Peptidsequenz der erfingungsgemäßen Proteine können synthetische Peptide generiert werden, die einzeln oder in Kombination als Antigene für die Produktion von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das PARP-Protein oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen. Gegenstand der Erfindung sind somit auch Peptidfragmente erfingungsgemäßer PARP-Proteine, welche charakteristische Teilsequenzen umfassen, insbesondere solche Oligo- oder

Polypeptide, welche wenigstens eines der oben genannten Sequenzmotive umfaßt. Solche Fragmente sind beispielsweise durch proteolytischen Verdau von PARP-Proteinen oder auf chemischem Weg durch Peptidsynthese erhältlich.

5

Neue spezifische PARP-Bindungspartner

Unter Verwendung der oben beschriebenen spezifischen Assay-Systeme für Bindungspartner von PARP1, PARP2 und PARP3 wurden aktive und selektive Inhibitoren gegen die erfindungsgemäßen Proteine entwickelt.

Erfindungsgemäß bereitgestellte Inhibitoren besitzt gegenüber PARP2 eine stark ausgeprägte inhibitorische Aktivität. Die K_i -Werte können dabei weniger als etwa 1000 nM, wie z. B. weniger als etwa 700 nM, weniger als etwa 100 nM und weniger als etwa 30 nM, wie z.B. etwa 1 bis 20 nM, betragen.

Erfindungsgemäß bevorzugte Inhibitoren besitzen eine überraschend ausgeprägte Selektivität für PARP2. Das Verhältnis $K_i(\text{PARP1}) : K_i(\text{PARP2})$ für erfindungsgemäße Inhibitoren ist nämlich z.B. größer als 5, vorzugsweise größer als 10, und insbesondere größer als 20 und liegt beispielsweise im Bereich von etwa 30 bis 100, wie z.B. etwa 40 bis 80. Eine weitere Gruppe von Inhibitoren wurde so entwickelt, daß sie PARP1 und PARP2 gleichzeitig inhibieren.

Beispielhaft ist zu nennen 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)-phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid. Diese Verbindung zeigte eine Selektivität von PARP2 ($K_i=7\text{nM}$) gegen PARP1 ($K_i=200\text{nM}$).

Für PARP-Homologe kodierende Nukleinsäuren:

Wenn keine anderen Angaben gemacht werden so erfolgt im Rahmen der vorliegenden Beschreibung die Angabe der Nukleotidsequenzen von 5'- in 3'-Richtung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die oben genannten Proteine, insbesondere für solche mit der in SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 und 10 dargestellten Aminosäuresequenz, kodieren, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein. Erfindungsgemäß brauchbare Nukleinsäuresequenzen umfassen auch Allelvarianten, die, wie oben für die Aminosäuresequenzen beschrieben, durch Deletion, Inversion, Insertion, Addition und/oder Substitution von Nukleotiden, vorzugsweise von Nucleotiden gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 7 und 9, erhältlich sind, wobei die biologischen Eigenschaften bzw. die biologische Aktivität des korrespondierenden

M

2005.09

21

Genprodukts aber im wesentlichen erhalten bleibt. Brauchbare Nukleotidsequenzen erhält man beispielsweise durch stumme (ohne Veränderung der Aminosäuresequenz) oder konservative (Austausch von Aminosäuren gleicher Größe, Ladung, Polarität oder Löslichkeit) Nukleotidsubstitutionen.

Weiterhin umfassen erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen auch funktionelle Äquivalente der Gene, wie eukaryontische Homologe beispielsweise aus Evertebraten, wie Caenorhabditis oder Drosophila, oder Vertebraten, vorzugsweise aus den oben beschriebenen Säugern. Bevorzugt sind Gene aus Vertebraten, die für ein Genprodukt kodieren, das die oben beschriebenen, erfindungswesentlichen Eigenschaften besitzt.

15 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in herkömmlicher Weise auf verschiedenen Wegen erhalten werden:

Beispielsweise kann eine genomische oder eine cDNA-Bibliothek auf DNA durchmustert werden, die für ein PARP-Molekül oder einen Teil davon kodiert. Beispielsweise kann eine aus menschlichem Gehirn, Herz oder Niere gewonnene DNA-Bibliothek mit einer geeigneten Sonde, wie z.B. einem markierten Einzelstrang-DNA-Fragment durchmustert werden, die einer aus SEQ ID NO: 1 oder 3 ausgewählten Teilsequenz geeigneter Länge oder dazu komplementären Sequenz entspricht. Dazu können beispielsweise die in einen geeigneten Klonierungsvektor überführten DNA-Fragmente der Bibliothek nach Transformation in ein Bakterium auf Agarplatten ausplattiert werden. Die Klone können anschließend auf Nitrozellulose-Filter übertragen und nach Denaturierung der DNA mit der markierten Sonde hybridisiert werden. Positive Klone werden dann isoliert und charakterisiert.

Die für erfindungsgemäße PARP-Homologe oder Teilfragmente kodierende DNA kann auch ausgehend von den in vorliegender Anmeldung enthaltenen Sequenzinformationen chemisch synthetisiert werden. Beispielsweise können hierfür Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 100 Basen in an sich bekannter Weise synthetisiert und sequentiell ligiert werden, indem man beispielsweise geeignete terminale Restriktionsschnittstellen vorsieht.

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen sind auch mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) herstellbar. Dazu hybridisiert man eine Target-DNA, wie z.B. DNA aus einem geeigneten Full-Length-Klon, mit einem Paar synthetischer Oligonukleotid-Primer von etwa 15 Basen Länge, welche an den gegenüberliegenden Enden der Target-DNA binden. Anschließend wird der dazwischenliegende Sequenzabschnitt mit DNA-Polymerase aufgefüllt. Die mehrfache

Wiederholung dieses Cyclus erlaubt eine Amplifizierung der Target-DNA (vgl. White et al.(1989), Trends Genet. 5, 185)

Weiterhin sind unter den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen
5 auch verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der kodierenden und nichtkodierenden, komplementären DNA-Sequenz, mRNA-Sequenzen und davon abgeleitete cDNAs zu verstehen.

Die Erfindung umfaßt weiterhin die mit obigen Sequenzen unter
10 stringenten Bedingungen hybridisierenden Nukleotidsequenzen. Stringente Hybridisierungsbedingungen im Sinne der vorliegenden Erfindung sind gegeben, wenn die hybridisierenden Sequenzen eine Homologie von etwa 70 bis 100%, wie z.B etwa 80 bis 100% oder 90 bis 100%, aufweisen (vorzugsweise in einem Aminosäureabschnitt
15 von mindestens etwa 40, wie z.B. etwa 50, 100, 150, 200, 400 oder 500 Aminosäuren).

Stringente Bedingungen für das Screening von DNA, insbesondere cDNA-Banken, sind z.B gegeben, wenn man bei einer Temperatur von
20 etwa 60°C mit 0,1X SSC-Puffer (20X SSC-Puffer = 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0) und 0,1% SDS den Hybridisierungsansatz wäscht.

Northern-Blot-Analysen werden unter stringenten Bedingungen beispielsweise bei einer Temperatur von etwa 65 °C mit 0,1X SSC,
25 0,1% SDS gewaschen.

Nukleinsäurederivate und Expressionskonstrukte:

30 Unter den Nukleinsäuresequenzen sind auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten oder alternative Spleißvarianten, zu verstehen. Die Promotoren, die den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen unter operativer Verknüpfung vorgeschaltet sind, können dabei durch Nukleotidaddition(en) oder -substitution(en),
35 Inversion(en), Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt wird. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen
40 ausgetauscht werden. Oben beschriebene Promotorvarianten werden zur Herstellung von erfindungsgemäßen Expressionskassetten herangezogen.

Als konkrete Beispiele für humanPARP2-Spleißvarianten sind zu
45 nennen:



Variante humanPARP2a: Deletion der Basenpaare 766 bis 904 (vgl. SEQ ID NO:1). Dies führt zu einem Frame-Shift mit einem neuen Stop-Codon ("TAA" gemäß Nucleotiden 922 bis 924 in SEQ ID NO:1). Variante humanPARP2b: Insertion von

- 5 5'- gta tgc cag gaa ggt cat ggg cca gca aaa ggg tct ctg -3'
nach Nukleotid 204 (SEQ ID NO:1). Dies verlängert die Aminosäuresequenz um den Einschub: GMPGRSWASKRVS

- Unter Nukleinsäurederivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -1000 vor dem Startcodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression erhöht wird.

- Neben der oben beschriebenen Nukleotidsequenz umfassen erfindungsgemäß brauchbare Nukleinsäurekonstrukte in funktioneller, operativer Verknüpfung einer oder mehrerer weiterer regulativer Sequenzen, wie Promotoren, Amplifikationssignale, Enhancer, Polyadenylierungssequenzen, Replikationsursprünge, Reportergene, selektierbare Markergene und dergleichen. Diese Verknüpfung kann je nach gewünschter Anwendung zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Genexpression führen.

- Zusätzlich zu den neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt, es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Strukturgene insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Auch am 3'-Ende der Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte regulatorische Elemente insertiert werden. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

- Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Expressionsverfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, l-PR- oder im l-PL-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefepromotoren ADC1, Mfa, AC, P-60, CYC1, GAPDH oder in den

Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte Expression bewirken.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Expression der Konstrukte:

Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem

stem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, beschrieben.

5

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate oder des rekombinanten Nukleinsäurekonstrukts ermöglichen. Unter

- 10 Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z.B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, As-
- 15 pergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder

20 transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Bei den transgenen Organismen kann es sich auch um sogenannte Knock-Out Tiere oder Pflanzen handeln, in denen das korrespondierende endogene Gen ausgeschaltet wurde, wie z.B. durch Mutation oder partielle oder vollständige Deletion.

25

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter System, die Phagen λ , μ oder andere temperente Phagen oder Transposons und/

30 oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bilden ein Expressionssystem. Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme beispielsweise die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

35

Wie oben beschrieben, kann das Genprodukt vorteilhaft auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der von der Nukleinsäure abgeleiteten RNA

40 zu programmieren.

Darüberhinaus kann das Genprodukt auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Isolierung des rekombinanten Proteins können vorteilhaft Vektorsysteme

45 oder Oligonukleotide verwendet werden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige

geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation, oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

Herstellung von Antikörpern:

Die Herstellung von Anti-PARP2-Antikörpern erfolgt in einer dem Fachmann geläufigen Weise. Mit Antikörpern sind sowohl polyklonale, monoklonale, humane oder humanisierte Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint, ebenso wie Antikörperfragmente, wie Fv, Fab und (Fab)'₂. Geeignete Herstellungsverfahren sind z.B. beschrieben in Campbell, A.M., Monoclonal Antibody Technology, (1987) Elsevier Verlag, Amsterdam, New York, Oxford und in Breitling, F. und Dübel, S., Rekombinante Antikörper (1997), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Weitere Anwendung der kodierenden Sequenz:

Die vorliegende cDNA bietet außerdem die Voraussetzung, die genomische Sequenz des neuen PARP-Gens zu klonieren. Darunter fällt auch die dazugehörige regulatorische oder Promotorsequenz, die beispielsweise durch Sequenzierung des 5'-stromaufwärts gelegenen Bereiches der erfindungsgemäßen cDNA zugänglich wird. Die Sequenzinformation der cDNA ist auch die Grundlage für die Herstellung von Antisense-Molekülen oder Ribozymen mit Hilfe bekannter Methoden (vgl. Jones, J.T. und Sallenger, B.A. (1997) Nat. Biotechnol. 15, 902; Nellen, W. und Lichtenstein, C. (1993) TIBS, 18, 419). Die genomische DNA kann ebenfalls zur Herstellung der oben beschriebenen Genkonstrukte verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidsequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener Tiere. Transgene Überexpression oder genetischer Knockout der Sequenzinformation in geeigneten Tiermodellen kann wertvolle weitere Informationen über
5 die (Patho-)Physiologie der neuen Enzyme liefern.

Therapeutische Anwendungen:

In Situationen, in denen ein Mangel an einem erfindungsgemäßen
10 Protein herrscht, können mehrere Methoden zur Substituierung eingesetzt werden. Zum einen kann das Protein, natürlich oder rekombinant direkt, oder gentherapeutisch in Form seiner kodierenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) appliziert werden. Dazu können beliebige Vektoren beispielsweise sowohl virale, als auch nichtvirale
15 Vehikel zum Einsatz kommen. Geeignete Methoden werden beispielsweise beschrieben von Strauss und Barranger in Concepts in Gene Therapy (1997), Walter de Gruyter, Hrsg. Eine weitere Alternative bietet die Stimulation des endogenen, körpereigenen Genes durch geeignete Mittel.

20

Auch der turn-over oder die Inaktivierung erfindungsgemäßer PARPs, z.B. durch Proteasen, können blockiert werden. Schließlich können Inhibitoren oder Agonisten erfindungsgemäßer PARPs zum Einsatz gelangen.

25

In Situationen, in denen überschüssiges PARP oder überaktiviertes PARP vorliegt, können unterschiedliche Typen von Inhibitoren eingesetzt werden. Diese Inhibition kann sowohl durch Antisense-Moleküle, Ribozyme, Oligonukleotide oder Antikörper, als auch durch
30 niedermolekulare Verbindungen erreicht werden.

Nicht-therapeutische Anwendungen:

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, wie z.B.
35 cDNA, die genomische DNA, der Promotor, als auch das Polypeptid, sowie Teilfragmente davon in rekombinanter oder nichtrekombinanter Form zur Ausarbeitung von verschiedenen Testsystemen verwendet werden.

40 Beispielsweise kann ein Testsystem etabliert werden, das geeignet ist, die Aktivität des Promotors oder des Proteins in Anwesenheit einer Testsubstanz zu messen. Bevorzugt handelt es sich dabei um einfache, z.B. colorimetrische, luminometrische, fluorimetrische, immunologische oder radioaktive, Meßmethoden, die die schnelle
45 Meßbarkeit, vorzugsweise einer Vielzahl von Testsubstanzen erlauben. Derartige Tests eignen sich vorteilhaft für ein sogenanntes High-Throughput-Screening. Diese Testsysteme erlauben eine Bewer-

tung von Testsubstanzen in Bezug auf deren Bindung an oder deren Agonisierung, Antagonisierung oder Inhibition von erfindungsgemäßen Proteinen.

- 5 Die Bestimmung von Menge, Aktivität und Verteilung der erfindungsgemäßen Proteine oder ihrer zugrundeliegenden mRNA im menschlichen Körper kann zur Diagnose, zur Bestimmung der Prädisposition und zum Monitoring bei bestimmten Erkrankungen dienen. Desgleichen kann die Sequenz der cDNA sowie der genomischen Sequenz zu Aussagen über genetische Ursachen und Prädispositionen bestimmter Erkrankungen herangezogen werden. Dazu können sowohl DNA/RNA-Sonden als auch Antikörper verschiedenster Art benutzt werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen oder Teile davon in Form geeigneter Sonden zur Aufdeckung von
- 15 Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen dienen.

- Weiterhin können die erfindungsgemäßen Proteine benutzt werden, um ihre natürlichen Liganden oder Interaktionspartner zu bestimmen und zu isolieren. Außerdem können die erfindungsgemäßen Proteine benutzt werden, um künstliche oder synthetische Liganden zu bestimmen und zu isolieren. Dazu kann man das rekombinant hergestellte oder gereinigte natürliche Protein derart derivatisieren, daß es Modifikationen trägt, die eine Verknüpfung mit Trägermaterialien erlauben. Derart gebundenen Proteine können mit unterschiedlichen Analyten, wie z.B. Proteinextrakten oder Peptidbibliotheken oder anderen Quellen für Liganden, inkubiert werden. Spezifisch gebundene Peptide, Proteine oder niedermolekulare, nichtproteinogene Substanzen können so isoliert und charakterisiert werden. Unter nichtproteinogenen Substanzen sind beispielsweise niedermolekulare, chemische Substanzen zu verstehen, die beispielsweise aus der klassischen Wirkstoffsynthese oder aus sogenannten Substanzbibliotheken stammen können, die mit Hilfe der Kombinatorik synthetisiert worden sind.

- 35 Die verwendeten Proteinextrakte sind beispielsweise abgeleitet aus Homogenaten von Pflanzen oder Pflanzenteilen, Mikroorganismen, menschlichen oder tierischen Geweben oder Organen.

- Liganden oder Interaktionspartner können ferner durch Verfahren, wie das Hefe "Two-Hybrid-System" identifiziert werden (Fields, S. und Song, O. (1989) Nature, 340, 245). Die dabei einsetzbaren Expressionsbanken sind beispielsweise ableitbar aus menschlichen Geweben, wie z.B. Gehirn, Herz, Niere usw.

- 45 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und die von ihnen kodierten Proteine können zur Entwicklung von Reagenzien, Agonisten und Antagonisten oder Inhibitoren zur Diagnose und Therapie von

- chronischen und akuten Erkrankungen, die mit der Expression einer der erfindungsgemäßen Proteinsequenzen, wie z.B. mit deren erhöhter oder erniedrigter Expression assoziiert sind, eingesetzt werden. Die entwickelten Reagenzien, Agonisten, Antagonisten oder
- 5 Inhibitoren können anschließend zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung oder Diagnose von Krankheiten verwendet. Dabei kann es sich beispielsweise um Erkrankungen des Gehirns, des peripheren Nervensystems, des Herz-Kreislaufsystems oder des Auges, von septischem Schock, der rheumatoiden Arthritis,
- 10 Diabetes, akutes Nierenversagen, oder von Krebs handeln.

- Die Relevanz der erfindungsgemäßen Proteine für die genannten Indikationen wurde mittels spezifischer Inhibitoren in relevanten Tiermodellen verifiziert (siehe Beispiele). In einem Modell für
- 15 neurodegenerative Erkrankungen (NMDA-Exzitotoxizität) war der spezifische PARP2-Inhibitor 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yl-oxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid überraschenderweise gut wirksam (ED50 <100 mg/kg).
- 20 Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert.

Beispiel 1: Isolierung der PARP2- und PARP3-cDNA

- 25 Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5' Stretch Plus cDNA Library, # HL3002a, Fa. Clontech) wurden die vorliegenden cDNA-Sequenzen erstmalig gefunden. Die Maus PARP3 Klone wurden aus einer "Tri-
- plex mouse brain cDNA library" (Clontech Bst.-Nr. ML5004t) iso-
- 30 liert. Die Sequenzen dieser Klone sind in SEQ ID NO:1, 3, 7 und 9 beschrieben.

Beispiel 2: Expression von PARP2 bzw. PARP3 in menschlichen Geweben

- 35 Die Expression von humanPARP2 bzw. humanPARP3 wurde in acht verschiedenen menschlichen Geweben mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Ein "Human Multiple Tissue Northern Blot (MTN™) der Firma Clontech (#7760-1 und #7780-1) wurde dazu mit einer RNA-
- 40 Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde durch in vitro Transkription der entsprechenden cDNA von humanem PARP2 bzw. humanem PARP3 in Anwesenheit Digoxigenin-markierter Nukleotide nach Vorschrift des Herstellers (BOEHRINGER MANNHEIM DIG Easy Hyb Best. Nr. 1603 558, DIG Easy Hyb Vorschrift für RNA:RNA Hybridisierung) hergestellt.
- 45 In Abänderung des Protokolls wurde die Vorhybridisierung: 2x1h unter Zugabe von Heringssperma DNA (10mg/ml Hybridisierungslösung) durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht

unter Zugabe von Heringssperma DNA (10mg/ml Hybridisierungslösung). Die Detektion der Banden erfolgte unter Verwendung des CDP-Star Protokoll (BOEHRINGER MANNHEIM CDP-Star™ Best. Nr. 1685 627).

5

Nach stringenter Waschung wurde das Transkript von PARP2 hauptsächlich im menschlichen Hirn, Herz, Skelettmuskel, Niere und Leber nachgewiesen. Die Größe des Transkriptes von ca. 1.9 kb entspricht der Länge der bestimmten cDNA (1.85kb) (vgl. Figur 2(A)).

10

In anderen Geweben oder Organen ist humanPARP2 deutlich schwächer exprimiert.

Nach stringenter Waschung wurde das Transkript von PARP3 hauptsächlich im Herzen, Gehirn, Niere, Skelettmuskel und Leber exprimiert. Die Expression in weiteren Geweben (Plazenta, Lunge, Bauchspeicheldrüse) ist deutlich schwächer (vgl. Figur 2(B)). Zu humanPARP3 gibt es mindestens 2 Transkripte, die vermutlich durch unterschiedliche Polyadenylierungsstellen oder alternatives Spleißen zu erklären sind. Deren Größe (ca. 2,2 kb bzw. 2,5 kb) entspricht der Länge der bestimmten cDNA (2.3kb). Gewaschen wurde 2 x 5 Minuten mit 0,2 x SSC/0,2 % SDS bei Raumtemperatur und dann 2 x 15 Minuten mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 65 °C (hergestellt aus 20X SSC: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0).

25

Beispiel 3: Herstellung von Antikörpern

Spezifische Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Proteine wurden hergestellt. Diese dienten u.a. der Analyse der Gewebeverteilung auf Proteinebene von PARP2 und PARP3 durch Immunoblot (Western-Blot) Analyse. Beispiele für die Herstellung solcher Antikörper sind im Folgenden angegeben.

Folgende Peptide wurden für die Antikörperherstellung synthetisch in der dem Fachmann geläufigen Weise hergestellt. Teilweise wurden den Sequenzen ein Cystein-Rest N- oder C-terminal angehängt, um die Kopplung an KLH (key hole limpet hemocyanin) zu erleichtern.

40 PARP-2: NH₂-MAARRRRSTGGGRARALNES-CO₂H (Aminosäuren 1-20)
NH₂-KTELQSPEHPLDQHYRNLHC-CO₂H (Aminosäuren 335-353)
PARP-3: NH₂-CKGRQAGREEDPFRSTAEALK-CO₂H (Aminosäuren 25-44).
NH₂-CKQQIARGFEALEALEEALK-CO₂H (Aminosäuren 230-248)

45 Als repräsentatives Beispiel ist die Herstellung eines Anti-PARP3 Antikörpers erläutert.

M

200509

31

Für das humane PARP3 wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen unter Verwendung eines synthetischen Peptides mit der Peptid-Sequenz $\text{H}_2\text{N-KQQIARGFEALEALEEALK-CO}_2\text{H}$ generiert (Aminosäuren 230-248 der humanen PARP3 Proteinsequenz). Die entsprechende Mausequenz in diesem Bereich unterscheidet sich lediglich um eine Aminosäure ($\text{H}_2\text{N-KQQIARGFEALEALEEAMK-CO}_2\text{H}$). N-Terminal wurde noch ein Cystein angehängt, um die Kopplung des Proteins an KLH zu ermöglichen.

Kaninchen wurden im Abstand von 7-14 Tagen insgesamt fünfmal mit dem KLH-Peptidkonjugat immunisiert. Das gewonnene Antiserum wurde gegen das Antigen affinitätsgereinigt. Die Isolierung der spezifischen IgG-Fraktion aus Serum erfolgte mittels der jeweiligen Peptide, die dazu zunächst in der dem Fachmann geläufigen Weise auf einer Affinitätssäule immobilisiert wurden. Auf diese Affinitätssäule wurde das jeweilige Antiserum gegeben, nichtspezifisch sorbierte Proteine wurden mit Puffer eluiert. Die spezifisch gebundene IgG-Fraktion wurde mit 0,2 M Glycin/HCl-Puffer pH 2,2 eluiert. Der pH-Wert wurde sofort mit einem 1M TRIS/HCl-Puffer pH 7,5 erhöht. Das Eluat mit der IgG-Fraktion wurde 1 : 1 (Volumen) mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und 30 min bei +4°C zur Komplettierung der Fällung inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde bei 10.000 g zentrifugiert, vom Überstand befreit und in möglichst wenig PBS/TBS gelöst. Die entstandene Lösung wurde anschließend gegen PBS/TBS im Verhältnis 1 : 100 (Volumen) dialysiert. Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von ca. 100 µg IgG/ml eingestellt. Die so aufgereinigten PARP3 Antikörper hatten eine hohe Spezifität gegenüber PARP3. Während mausPARP3 gut erkannt wurde, war keine Kreuzreaktion mit PARP1 oder PARP2 zu beobachten.

30

Beispiel 4: Analyse der Gewebeverteilung mittels Immunoblots (Western Blot)

Die Gewebeverteilung auf Proteinebene wurde für PARP2 und PARP3 ferner durch Immunoblot (Western-Blot) Analyse untersucht.

Aufbereitung der Maus-Gewebe für Proteingele:

Gewebe oder Zellen wurden mittels Potter oder Ultra-Turrax homogenisiert. Dazu wurden 0.5g Gewebe (oder Zellen) in 5ml Puffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 6 mM MgCl_2) einer Tablette Proteasen Inhibitoren-Cocktail (Boehringer Mannheim, Best.Nr.: 1836153) und Benzonase (Reinheitsgrad I, MERCK) 30 min. bei 37 °C inkubiert. Es wurden Gewebeproben aus der Maus für Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Darm, Muskel, Gehirn und für humane embryonale Nierenzellen (HEK293, human embryonal kidney) hergestellt.

Protein-Gele:

Für Protein-Gele wurde das NuPAGE-System der Firma NOVEX gemäß Vorschrift verwendet. Zum Einsatz kamen Polyacrylamidgele (NuPAGE 4-12% BisTris, NOVEX NP 0321), Laufpuffer (MES-Running Buffer, NOVEX NP 0002), Anti-Oxidant (NOVEX NP 0005), Protein-Größenstandard (Multi Mark Multi Colored Standard, NOVEX LC 5725), Probenpuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), NOVEX NP 0007). Die Laufzeit der Gele betrug 45 Minuten bei einer Spannung von 200V.

10

Western Blot:

Western Blots wurden mit dem System der Firma NOVEX nach Vorschrift durchgeführt. Verwendet wurde eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Pore size 45 µm, NOVEX LC 2001). Die Transferzeit betrug 1 Stunde bei einer Stromstärke von 200mA. Der Transferpuffer bestand aus 50 ml Transferpuffer Konzentrat (NOVEX NP 0006), 1 ml Anti-Oxidant (NOVEX NP 0002), 100 ml Methanol p.a. und 849 ml H₂O bidest.

20

Neben den so hergestellten Blots wurden zudem vorgefertigte Blots, z.B. der Firma Chemicon (Mouse Brain Blot, Chemicon, Katalog Nr.: NS 106 mit den Geweben 1. Frontal Cortex, 2. Posterior Cortex, 3. Cerebellum, 4. Hippocampus, 5. Olfactory bulb, 6. Striatum, 7. Thalamus, 8. Mittelhirn, 9. Entorhinal Cortex, 10. Pons, 11. Medulla, 12. Rückenmark) verwendet.

Antikörperreaktion gegen PARP3:

Die Western-Blots wurden mindestens 2 Stunden in TBST (TBS + 0,3 % Tween 20) mit 5% Trockenmilchpulver blockiert (TBS: 100 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl). Die Antikörperreaktion mit dem primären Antikörper (1:1000 Verdünnung) erfolgte für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln (Überkopfschüttler) in TBST mit 5% Trockenmilchpulver (siehe oben. Anschließend wurde dreimal für 5 Minuten in TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Rabbit IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA A-6154, Verdünnung 1:2.000) erfolgte 1 Stunde in TBST mit 5% Trockenmilchpulver. Anschließend wurde wie oben dreimal je 5 Minuten gewaschen. Es folgte die Detektion basierend auf Chemilumineszenz mit dem SUPER BLAZE Kit (Pierce, Signal BLAZE Chemiluminescent Substrate 34095) nach Angabe der Hersteller. Verwendet wurden der "Lumi-Film" (Chemiluminescent Detection Film, Boehringer Best.Nr.: 1666916. Die Filme wurden ca. 2 min. entwickelt (Röntgenentwicklerkonzentrat, ADEFO-Chemie GmbH), gewässert, ca. 4 min. fixiert (Acidofix 85

g/l /AGFA), gewässert und abschließend getrocknet.

Beispiel 5: Herstellung der Enzyme

5

Humanes PARP1 wurde zum Vergleich rekombinant im Baculovirus-System in der dem Fachmann geläufigen Weise exprimiert und wie beschrieben (Shah et al., Analytical Biochemistry 1995, 227, 1-13) partiell aufgereinigt. Rinder PARP1 in einer 30-50%igen Reinheit (c= 0,22 mg/ml, spez. Aktivität 170 nmol ADP-ribose/min/mg Gesamtprotein bei 25 °C) wurde von BIOMOL (Best.-Nr. SE-165) bezogen. Humanes und Maus PARP2 und PARP3 wurden rekombinant im Baculovirus-System (Bac-to-Bac System, BRL LifeScience) exprimiert. Dazu wurden die entsprechenden cDNAs in den pFASTBAC-1-Vektor kloniert. Nach Herstellung von rekombinanter Baculovirus-DNA durch Rekombination in E. coli, erfolgte Transfektion von Insektenzellen (Sf9 oder High-Five) mit den entsprechenden rekombinanten Baculovirus-DNAs. Die Expression der entsprechenden Proteine wurde durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Virenstämme wurden in der dem Fachmann geläufigen Weise amplifiziert. Größere Mengen rekombinanter Proteine wurden durch Infektion von 500 ml Insektenzellkultur (2×10^6 Zellen/ml) mit Viren in einer MOI (multiplicity of infection; Verhältnis von Viren zu Zellen) von 5-10 infiziert und 3 bis 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Insektenzellen durch Zentrifugation pelletiert und die Proteine aus dem Pellet aufgereinigt.

Die Aufreinigung erfolgte durch klassische, dem Fachmann geläufige Methoden der Proteinreinigung unter Detektion der Enzyme mit entsprechenden spezifischen Antikörpern. Teilweise wurden die Proteine auch über eine 3-Aminobenzamid/Affinitätssäule wie beschrieben (Burtscher et al., Anal Biochem 1986, 152:285-290) affinitätsgereinigt. Die Reinheit betrug >90%.

35

Beispiel 6: Testsysteme für die Bestimmung der von Aktivität von PARP2 und PARP3 und der Inhibitorischen Wirkung von Effektoren auf PARP1, PARP2 und PARP3.

40 a) Herstellung von Antikörpern gegen Poly-(ADP-ribose)

Als Antigen zur Generierung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern kann Poly-(ADP-ribose) verwendet werden. Die Herstellung von Anti-Poly-(ADP-ribose) Antikörpern ist in der Literatur beschrieben. (Kanai Y et al. (1974) Biochem Biophys Res Comm 59:1, 300-306; Kawamatsu H et al. (1984) Biochemistry 23, 3771-3777; Kanai Y et al. (1978) Immunology 34, 501-508).

Unter anderem wurden verwendet: Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (polyklonales Antiserum, Kaninchen), BIOMOL; Best.-Nr. SA-276. Anti Poly-(ADP-ribose)-Antikörper (monoklonal, Maus; Klon 10H; 5 Hybri-omaüberstand, affinitätsgereinigt).

Die Antiseren oder aus Hybridomakulturüberstand gewonnenen monoklonalen Antikörper wurden durch eine Protein-A-Affinitätschromatographie in der dem Fachmann geläufigen Weise aufgereinigt.

10

b) ELISA-Assay

Materialien:

15 ELISA Farbreagenz: TMB-Fertigmix SIGMA T-8540

Eine 96-well Mikrotiterplatte (FALCON Micro-Test IIIä Flexible Assay Plate, # 3912) wurde mit Histonen (SIGMA, H-7755) beschichtet. Histone wurden hierfür in Carbonatpuffer (0.05M Na_2HCO_3 ; pH 9.4) in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gelöst. Die einzelnen Wells der Mikrotiterplatte wurden mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit je 150 μl dieser Histone-Lösung inkubiert. Anschließend werden die Wells durch Zugabe von 150 μl einer 1%igen BSA-Lösung (SIGMA, A-7888) in Carbonatpuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Es folgen drei Waschschritte mit Waschpuffer (0,05% Tween10 in 1x PBS; PBS (Phosphate buffered saline; Gibco, Best.-Nr. 10010): 0.21g/l KH_2PO_4 , 9g/l NaCl, 0.726g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4). Waschschritte wurden durchweg mit einem Mikrotiterplatten-Waschgerät durchgeführt (Mikrotiterplatten-Wäscher "Columbus", SLT-Labinstruments, Österreich).

Für die Enzymreaktion wurden eine Enzymreaktionslösung und eine Substratlösung jeweils als "Pre-Mix" benötigt. Die absolute Menge dieser Lösungen richtete sich nach der Anzahl der vorgesehenen Test-Wells.

Zusammensetzung der Enzymreaktionslösung pro Well:

- 4 μl PARP-Reaktionspuffer (1M Tris-HCl pH 8.0, 100mM MgCl_2 , 10mM DTT)
- 20ng PARP1 (human oder bovin) oder 8ng PARP2 (Human oder Maus)
- 4 μl aktivierte DNA (1 mg/ml; SIGMA, D-4522)
- ad 40 μl H_2O

45 Zusammensetzung der Substrat-Lösung pro Well:

- 5 μl PARP-Reaktionspuffer (10x)

- 0.8 µl NAD-Lösung (10mM, SIGMA N-1511)
- 44 µl H₂O

Inhibitoren wurden in 1x PARP-Reaktionspuffer gelöst. DMSO, daß
5 gelegentlich zum Lösen von Inhibitoren in höheren Konzentrationen
verwendet wurde, war bis zu einer Endkonzentration von 2% unpro-
blematisch. Für die Enzymreaktion wurden 40 µl der Enzymreaktions-
lösung pro Well vorgelegt und mit 10 µl Inhibitor-Lösung für 10
Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch Zu-
10 gabe von 50 µl Substrat-Lösung pro Well gestartet. Die Reaktion
wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend
durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer gestoppt.

Als primäre Antikörper wurden spezifische Anti-Poly-(ADP-ribose)
15 Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Verdünnung
erfolgte in Antikörper-Puffer (1% BSA in PBS; 0.05% Tween20). Die
Inkubationszeit für den primären Antikörper betrug eine Stunde
bei Raumtemperatur. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit
Waschpuffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtempera-
20 tur mit dem sekundärem Antikörper (Anti-Maus-IgG, Fab-Fragmente,
Peroxidase gekoppelt, Boehringer Mannheim, Best.-Nr. 1500.686;
Anti-Rabbit-IgG, Peroxidase gekoppelt, SIGMA, Best.-Nr. A-6154)
in einer 1:10000 Verdünnung in Antikörperpuffer. Nach dreimaligem
Waschen mit Waschpuffer folgte die Farbreaktion unter Verwendung
25 von 100 µl Farbreagenz (TMB-Fertigmix, SIGMA) pro Well für ca. 15
min. bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von
100 µl 2M H₂SO₄ gestoppt. Danach wurde sofort im ELISA-Platten-Le-
segerät ("Easy Reader" EAR340AT, SLT-Labinstruments, Österreich)
gemessen (450nm gegen 620nm). Das Messprinzip ist schematisch in
30 Figur 6 dargestellt.

Für die Ermittlung des K_i-Wertes eines Inhibitors wurden verschie-
dene Konzentrationen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve
herangezogen. Für eine bestimmte Inhibitorkonzentration werden
35 3fach-Werte erhoben. Arithmetische Mittelwerte werden mit Micro-
soft® Excel ermittelt. Die IC₅₀-Bestimmung erfolgt mit der Micro-
cal® Origin Software (Vers. 5.0) ("Sigmoidal Fit"). Umrechnung
der so berechneten IC₅₀-Werte auf K_i-Werte erfolgte durch Verwen-
dung von "Eich-Inhibitoren". Die "Eich-Inhibitoren" wurden bei
40 jeder Analyse mitgemessen. Der K_i-Werte der "Eich-Inhibitoren"
wurde im gleichen Testsystem durch Dixon-Diagramm Analyse in der
dem Fachmann geläufigen Weise ermittelt.

b) HTRF-(Homogenous time-resolved fluorescence) Assay

Beim erfindungsgemäßen HTFR-PARP-Assay werden Histone als Zielproteine der Modifikation durch PARP indirekt mit einem XL665-Fluorophor markiert. Der Antikörper wird direkt mit einem Europium-Kryptat markiert. Befindet sich das XL665-Fluorophor in einer unmittelbaren räumlichen Nähe, die durch eine Bindung an die Poly-(ADP-ribose) am Histon gewährleistet wird, dann ist eine Energieübertragung möglich. Die Emission bei 665 nm ist somit direkt proportional zu der Menge an gebundenem Antikörper, der wiederum der Poly-(ADP-ribose) Menge entspricht. Somit entspricht das gemessene Signal der PARP Aktivität. Das Meßprinzip ist schematisch in Figur 7 dargestellt. Die verwendeten Materialien sind, wenn nicht ausdrücklich angegeben, identisch mit denen im ELISA Assay (s.o.) verwendeten.

- 15 Histone wurden in Hepes-Puffer (50mM, pH=7.5) zu 3mg/ml gelöst. Biotinylierung erfolgte mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, #21335T). Ein molares Verhältnis von 4 Biotin pro Histon wurde verwendet. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten (RT). Anschließend wurden die biotinylierten Histone über eine G25 SF HR10/10 Säule (Pharmacia, 17-0591-01) in Hepes Puffer (50mM, pH=7.0) aufgereinigt, um überschüssiges Biotinylierungsreagenz zu entfernen. Der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper wurde mittels bifunktionaler Kopplungsreagenzien mit Europium-Kryptat markiert (Lopez, E. et al., Clin. Chem. 39(2), 196-201 (1993); US-Patent 5,534,622).
- 25 Die Reinigung erfolgte auf einer G25SF HR10/30 Säule. Ein molares Verhältnis von 3.1 Kryptaten pro Antikörper wurde erzielt. Die Ausbeute betrug 25%. Die Konjugate wurden in Gegenwart von 0.1% BSA in Phosphatpuffer (0.1M, pH=7) bei -80°C gelagert.
- 30 Für die Enzymreaktion wurden pro Well zusammenpipettiert:
- 10 µl PARP-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgCl₂, 1mM DTT) mit 20ng PARP1 (human oder bovin) oder 8ng PARP2 (Human oder Maus)
 - 10 µl aktivierte DNA in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (50µg/ml)
- 35 - 10 µl biotinylierte Histone in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (1.25µM)
- 10 µl Inhibitor in PARP-HTRF-Reaktionspuffer

Diese Reagenzien wurden 2 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von

40 - 10 µl NAD-Lösung in PARP-HTRF-Reaktionspuffer (41 µM/ml) gestartet wurde. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

37

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von

- 10 µl PARP-Inhibitor (25 µM, $K_i=10\text{nM}$) in "Revelation"-Puffer (100mM Tris-HCl pH 7.2, 0.2M KF, 0.05% BSA) gestoppt.

5

Danach wurden zugegeben:

- 10 µl EDTA-Lösung (SIGMA, E-7889, 0.5M in H₂O)
- 100 µl Sa-XL665 (Packard Instruments) in "Revelation"-Puffer (15-31.25nM)
- 10 - 50 µl Anti-PARP-Kryptat in "Revelation"-Puffer (1.6-3.3nM).

Nach 30 Minuten (bis 4 Stunden) konnte dann gemessen werden. Die Messung erfolgte auf einem "Discovery HTRF Microplate Analyzer" (Packard Instruments). Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte wie

15 beim ELISA Assay beschrieben.

Beispiel 7: Testsysteme zur Bestimmung der therapeutischen Wirksamkeit von PARP-Inhibitoren

20

Neue PARP-Inhibitoren können in relevanten pharmakologischen Modellen auf ihre therapeutische Wirksamkeit überprüft werden. Beispiele für einige geeignete Modelle sind dazu in Tabelle 1 aufgeführt.

25

	Krankheit	Modell	Literatur
30	Neurodegenerative Erkrankungen (Schlaganfall, Parkinson etc.)	NMDA-Exzitotoxizität in der Maus oder Ratte	Beschreibung siehe unten
35	Schlaganfall	Permanente MCAO ("middle cerebral arterial occlusion")	Tokime, T. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 18(9): 991-7, 1998. Guegan, C., Brain Research. Molecular Brain Research, 55(1): 133-40, 1998.

40

45

5

10

15

20

25

30

35

40

45

	Transiente, fokale MCAO in Ratte oder Maus	Eliasson MJL et al., Nat Med 1997, 3:1089-1095. Endres, M et al., J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1143-1151. Takahashi K et al., J Cereb Blood Flow Metab 1997, 17:1137-1142.
Parkinsonsche Krankheit	MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridin) Toxizität in der Maus/Ratte	Cosi C, et al., Brain Res., 1998 809(1):58-67. Cosi C, et al., Brain Res., 1996 729(2):264-9.
Herzinfarkt	Koronargefäß-Okklusion an Ratte, Schwein oder Kaninchen	Richard V, et al., Br. J. Pharmacol 1994, 113, 869-876. Thiemermann C, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1997, 94(2):679-83. Zingarelli B, et al., Cardiovasc Res. 1997, 36(2):205-15.
	Langendorfhherzmodell an Ratte oder Kaninchen	Beschreibung siehe unten
Septischer Schock	Endotoxin Schock in der Ratte	Szabo C, et al., J Clin Invest, 1997, 100(3):723-35.
	Zymosan oder Carra-geenan induziertes multiples Organversagen in Ratte oder Maus	Szabo C, et al. J Exp Med. 1997, 186(7):1041-9. Cuzzocrea S, et al. Eur J Pharmacol. 1998, 342(1):67-76.
Rheumatoide Arthritis	Adjuvant oder Collagen induzierte Arthritis in Ratte oder Maus	Szabo C, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(7):3867-72.

5	Diabetes	Streptozotocin und Alloxan induziert bzw. Obesity assoziiert	Uchigata Y et al., Diabetes 1983, 32: 316-318. Masiello P et al., Diabetologia 1985, 28: 683-686. Shimabukuro M et al., J Clin Invest 1997, 100: 290-295.
10	Krebs	In vitro-Modell; s.u.	Schlicker et al., 1999, 75(1), 91-100.

a) Modell der NMDA-Exzitotoxizität

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Unter normalen Bedingungen wird Glutamat in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und stimuliert die post-synaptischen Glutamat-Rezeptoren, spezifisch die Glutamat-Rezeptoren vom "NMDA"- und "AMPA"-Typ. Diese Erregung spielt eine bedeutende Rolle bei zahlreichen Hirnfunktionen einschließlic Lernen, Gedächtnis und motorische Kontrolle.

Unter Bedingungen der akuten und chronischen Neurodegeneration (z.B. Schlaganfall) erfolgt jedoch ein starker Anstieg der prä-synaptischen Glutamat-Ausschüttung, was eine exzessive Stimulation der Rezeptoren zur Folge hat. Dies führt zum Zelltod der entsprechend erregten Zellen. Bei einer Reihe von neurologischen Krankheiten oder psychischen Störungen treten diese erhöhten Glutamat-Aktivitäten auf, die zu Zuständen von Übererregungen oder toxischen Effekten im zentralen Nervensystem (ZNS) aber auch im peripheren Nervensystem führen. Somit ist Glutamat in eine Vielzahl neurodegenerativen Erkrankungen involviert, insbesondere neurotoxischen Störungen nach Hypoxie, Anoxie, Ischämie und nach Läsionen, wie sie nach Schlaganfall und Trauma auftreten, Schlaganfall, Alzheimersche Erkrankung, Huntington-Erkrankung, Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS; "Lou Gehrigs"-Erkrankung), Kopf-Trauma, Rückenmarks-Trauma, periphere Neuropathien, AIDS Demenz und die Parkinsonsche Krankheit. Eine weitere Erkrankung in der Glutamat-Rezeptoren von Bedeutung sind, ist Epilepsie. (vgl. Brain Res Bull 1998; 46(4):281-309, Eur Neuropsychopharmacol 1998, 8(2):141-52.).

Glutamat vermittelt seine Effekte über verschiedene Rezeptoren. Einer dieser Rezeptoren wird nach einem spezifischen Agonisten NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor genannt. (Arzneim.Forschung 1990, 40, 511-514; TIPS, 1990, 11, 334-338; Drugs of the Future 1989, 14, 1059-1071). N-Methyl-D-aspartat ist ein starker Agonist einer bestimmten Klasse von Glutamat-Rezeptoren ("NMDA"-Typ). Die

Erregung des NMDA-Rezeptors führt zum Calcium-Einstrom in die Zelle und zur Erzeugung von Radikalen. Die Radikale führen zur DNA-Schädigung und zur Aktivierung von PARP. PARP wiederum verursacht durch eine Depletion der Zelle an energiereichen Phosphaten (NAD und ATP) den Zelltod. Dies erklärt die Toxizität von NMDA. Behandlung von Tieren mit NMDA kann daher als Modell gesehen werden für die oben genannten Erkrankungen, bei denen Exzitotoxizität eine Rolle spielt.

- 10 Aufgrund der Bedeutung der Glutamat-Rezeptoren in der Neurodegeneration waren viele pharmakologische Ansätze bislang darauf gerichtet, eben diese Rezeptoren spezifisch zu blockieren. Aufgrund ihrer Bedeutung in der normalen Reizleitung haben sich diese Ansätze jedoch als problematisch erwiesen (Nebenwirkungen). Zudem ist die Erregung der Rezeptoren ein sehr schnell erfolgendes Ereignis, so daß die Applikation der Rezeptoren oft zu spät kommt ("Zeitfenster"-Problem). Der Bedarf an neuen Wirkprinzipien und Inhibitoren der NMDA-bedingten Neurotoxizität ist daher hoch.

20

Der Schutz gegen zerebrale Übererregung durch exzitatorische Aminosäuren (NMDA-Antagonismus an der Maus) kann als hinreichender Beleg der Wirksamkeit eines pharmakologischen Effektors von PARP in Erkrankungen beruhend auf Exzitotoxizität gelten. Durch intrazerebrale Applikation von exzitatorischen Aminosäuren EAA (Excitatory Amino Acids) wird eine so massive Übererregung induziert, daß diese in kurzer Zeit zu Krämpfen und zum Tod der Tiere (Maus) führt.

- 30 Im vorliegenden Fall wurden 10 µl einer 0.035%igen wäßrigen NMDA-Lösung 120 Minuten nach intraperitonealer Gabe (ip.-Gabe) der zu prüfenden Substanz einseitig intracerebroventrikulär appliziert. Durch systemische, z.B. intraperitoneale, Gabe von zentralwirksamen Wirkstoffen lassen sich diese Symptome hemmen. Da die exzessive Aktivierung von EAA-Rezeptoren des Zentralnervensystems in der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt, kann aus dem nachgewiesenen EAA-Antagonismus in vivo auf eine mögliche therapeutische Verwendbarkeit der Substanzen gegen derartige ZNS-Erkrankungen geschlossen werden. Als Maß für die Wirksamkeit der Substanzen wurde ein ED50-Wert bestimmt, bei dem 50% der Tiere durch eine festgelegte Dosis von entweder NMDA durch die vorangegangene ip-Gabe der Meßsubstanz symptomfrei werden.

45

Der spezifische PARP2-Inhibitor 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yl-oxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid zeigt hier überraschenderweise eine Wirksamkeit mit einem ED50 von ca.30mg/kg.

5

b) Langendorfhertzmodell (Model für Herzinfarkt)

Für den Test wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Körpergewicht 300-400 g; Herkunft Janvier, Le Genest-St-Isle, France) verwendet. Die Ratten wurden oral mittels Schlundsonde mit der Wirksubstanz oder Placebo behandelt (Volumen: 5 ml/kg). 50 Minuten später wird Heparin intraperitoneal appliziert (Liquemin N Roche, 125 IU/animal in 0.5 ml). Die Tiere werden mit Inactin® T133 (Thiobetabarbitat Natrium, 10 %) anaesthetisiert, auf dem Operationstisch fixiert, tracheotomisiert und mit einer "Harvard Atempumpe" (40 Schläge/min, 4.5 ml/Schlag) beatmet. Der Thorakotomie folgt eine sofortige Katheterisierung der Aorta, Exstirpation des Herzens und sofortige retrograde Perfusion. Die Herzen wurden mit einem konstanten Druck von 75 mmHg perfundiert, was mittels einer "Gilson Minipuls 2 Perfusionspumpe" erreicht wird. Zusammensetzung des Perfusats (mmol/l): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ x 2 H₂O 2.52, MgSO₄ x 7 H₂O 1.64, NaHCO₃ 24.88, KH₂PO₄ 1.18, Glukose 11. Die Temperatur wird während des gesamten Experimentes auf 37 °C gehalten. Funktionelle Parameter wurden mittels eines "Gould 4-Kanal-Schreibers" kontinuierlich aufgezeichnet. Gemessen wurden der linksventrikuläre Druck (LVP; mmHg), LVEDP (mmHg), Enzymfreisetzung (Creatinkinase, mU/ml/g), Koronarflußrate (ml/min), HR (Pulsfrequenz, min⁻¹). Der links-ventrikuläre Druck wurde mittels eines flüssigkeitgefüllten Latexballons und eines Druckaufnehmers-Statham23 Db gemessen. Das Volumen des Ballons wurde anfänglich angepaßt, um einen LVEDP (left ventricular end diastolic pressure) von ca.12 mmHg zu erreichen. Dpdt_{max} (maximale Pumpkraft) wird aus dem Drucksignal mittels eines Differentiatormoduls abgeleitet. Die Herzfrequenz wurde aus dem Drucksignal errechnet. Die Flußrate wurde mittels Tropfenzähler (BMT Messtechnik GmbH Berlin) bestimmt. Nach einer Äquilibrierzeit von 20 Minuten, wurden die Herzen einer 30 minütigen globalen Ischämie unterworfen, die durch den Stop der Perfusatzufuhr bei Temperierung auf 37 °C realisiert wird. Während der folgenden Reperfusionperiode von 60 Minuten wurden Proben des Perfusats nach 3, 5, 10, 15, 30, 45 und 60 min zur Analyse der Creatinkinase (CK) Aktivität entnommen. Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Parameter wurden statistisch analysiert (Dunnett Test). Die Signifikanzgrenze lag bei p=0.05.

45

Ähnlich wurde der Versuch an Kaninchenherzen durchgeführt. Verwendet wurden männliche, weiße Neuseeländer Kaninchen (Bezug: In-

terfauna). Die Präparation der Herzen erfolgte wie oben im Rattenmodell beschrieben. Der Perfusionsdruck wurde auf maximal 60 mmHg, der Fluß auf ca 25ml/min eingestellt. Die Äquilibrierzeit betrug ca 30 min. Die Substanzapplikation erfolgte per Infusion
5 direkt vor das Herz. 15 min nach Start der Infusion wurde eine 30 minütige globale Ischämie durch stop-flow unter Temperierung des Herzens gesetzt. Es folgt eine 30 minütige Reperfusion. Abnahme von Perfusat für Untersuchung von CK-Aktivität erfolgte vor Substanzgabe, nach 15 min, und zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 10,
10 15, 20, 30 min) während der Reperfusion. Gemessen wurden die Parameter: LVP (mmHg), LVEDP, LVdP/dt, PP (mmHg), HR (Pulsfrequenz; Schläge/min), CK-Aktivität (U/min/g Herzgewicht).

c) Tiermodell für akutes Nierenversagen

15

Untersucht wurde die protektive Wirkung von PARP-Inhibitoren bei einer intravenösen Gabe (4 Tage) auf die Nierenfunktion von Ratten mit postischämischem akutem Nierenversagen.

- 20 Verwendet wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (ca. 330g bei Versuchsbeginn; Züchter: Charles River). Es wurden 10-15 Tiere pro Versuchsgruppe eingesetzt. Die Applikation von Wirksubstanz/Placebo erfolgte kontinuierlich mit osmotischer Mikropumpe in die V. femoralis. Blutabnahme erfolgte orbital (1,5ml Vollblut) unter
25 Inhalationsnarkose mit Enfluran (Ethrane Abbott, Wiesbaden).

Nach Ermittlung der Vorwerte (Blutentnahme) und Bestimmung der in 24h ausgeschiedenen Urinmenge wurden die Ratten narkotisiert ("Nembutal", Pentobarbital-Natrium, Sanofi CEVA; 50mg/kg i.p.,

- 30 Injektionsvolumen 1,0 ml/kg) und auf einem heizbaren OP-Tisch (37°C) befestigt. Es folgte Heparingabe (Liquemin N, Roche) 125 IU/kg i.v. in die Vena caudalis. Der Bauchraum wurde eröffnet und
1) die rechte Niere freigelegt. Die abzweigende Nierenarterie wurde freigelegt und mit Bulldogklemmen (nach Diefenbach 38mm) von oben
35 her abgeklemmt. Die linke Nierenarterie wurde ebenfalls freigelegt und abgeklemmt (von oben her, ca. 1/2 Strecke zur Niere). Während der Operation wurde eine osmotische Mikropumpe in die V. femoralis implantiert. Der Darm wurde wieder eingefügt und der Flüssigkeitsverlust mit lauwarmer 0,9 % NaCl ausgeglichen. Die
40 Tiere wurden mit einem feuchtem Tuch abgedeckt und unter Rotlicht warm gehalten. Nach 40 min wurde das Aussehen der Nieren dokumentiert und rechts, danach links die Klammer entfernt. Der Darm wurde zurückgelegt und 2 Tropfen Antibiotikum (Tardomyocel, Bayer) wurden zugeben. Die Bauchdecke wurde mit sterilem Catgut
45 (Ethicon Nr.4) geschlossen und nochmals mit 1 Tropfen Antibiotikum behandelt. Die Oberhaut wurde mit sterilem Ethibond Exel (Ethicon) Nr.3/0 genäht und die Naht mit Wundspray Nebacetin N (Yama-

nouchi) besprüht. Ein Zehntel Tagesdosis Wirkstoff/Placebo wird als Bolus i.v. geben.

Für die Versuchstage 1, 2 und 4 erfolgte Proben- und Blutentnahme
5 für die Untersuchung klinisch chemischer Parameter in Serum und
Urin: Na, K, Creatinin, Protein (nur in Urin). Ferner wurden Fut-
ter- und Wasserverbrauch, Körpergewicht und Urinvolumen festge-
halten. Nach 14 Tagen wurden die Tiere getötet und die Nieren be-
gutachtet.

10

Für die Auswertung wurden alle Tiere, die während des Versuchs an
einem Infarkt verstarben, bzw bei Sektion am Tag 14 einen Infarkt
aufwiesen, ausgeschlossen. Berechnet wurden die Creatinin-Clea-
rance und die fraktionale Natriumexkretion als Nierenfunktionspa-
15 rameter unter Vergleich von behandelten Tieren mit Kontrolle und
Sham.

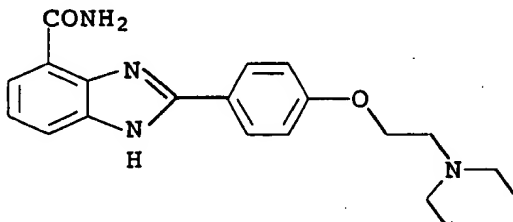
d) In vitro-Modell für die Radiosensitisierung (Tumorthherapie)

20 MCF-7-Zellen (humanes Brustkarzinom) wurden in Dulbecco's modifi-
ziertem Eagles Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 2 mM L-
Glutamin kultiviert. Zellen wurden über Nacht ausgesäht in Zell-
dichten von 100, 1000 oder 10000 Zellen pro Well in einer 6-Well-
Platte und anschließend einer ionisierenden Strahlung mit einer
25 Dosis in einem Bereich von 0 bis 10 Gy (^{137}Cs , Shepard Mark, Mo-
del, Model I-68A, Dosisrate von 3,28 Gy/min) ausgesetzt. 10 Tage
nach der Bestrahlung wurde der Versuch ausgewertet, wobei Kolo-
nien mit 50 Zellen als positiv gezählt wurden.

30

Beispiel 8: Herstellung des PARP-Inhibitors 2(4(2-(N,N-Diethyl-
amino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

35



40

45

a) 4(2-(N,N-Diethylaminoeth-1-yloxy)benzaldehyd

15 g (122 mMol) 4-Hydroxybenzaldehyd, 16,7 g (122 mMol) N(2-Chlorethyl)-N,N-diethylamin und 33,9 g (246 mMol) Kaliumcarbonat wurden zusammen mit einer Spatelspitze 18-Krone-6 in 300 ml Ethylmethylether 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat im Vakuum eingedunstet. Der Rückstand wurde zwischen Ether und 2M Natronlauge verteilt, die Etherphase abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Man erhielt 24,8 g des Zwischenproduktes.

b) 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureethylester

2 g (11 mMol) 2,3-Diaminobenzoessäureethylester und 1,4 ml konzentrierte Essigsäure wurden in 25 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 3,2 g (14,4 mMol) der Zwischenverbindung aus Stufe a, gelöst in 50 ml Methanol, innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Danach wurden 2,9 g (14,4 mMol) Kupfer-II-acetat, gelöst in 37,5 ml warmem Wasser, zügig zugetropft und anschließend alles für 20 Minuten unter Rückfluß gekocht. Man kühlte die Reaktionslösung auf 50 °C und gab 4,5 ml 32 %iger Salzsäure zu. Danach tropfte man vorsichtig eine Lösung aus 4,3 g Natriumsulfid-Hydrat in 25 ml Wasser zu und rührte alles noch für 15 Minuten. Die Reaktionslösung wurde auf Eiswasser gegossen und der anfallende Niederschlag abgesaugt. Das Filtrat wurde mit wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung alkalisch gestellt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Man erhielt 4,4 g des Zwischenproduktes.

c) 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäurehydrazid

Zu 4,1 g (10,7 mMol) der Zwischenverbindung aus Stufe b in 30 ml Ethanol wurden 2,7 g (54 mMol) Hydrazinhydrat gegeben und alles 10 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand zwischen Wasser und Essigester verteilt. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Der so erhaltene Rückstand wurde noch mit Ether behandelt und erneut abgesaugt, wonach man 1,7 g der Zwischenverbindung erhielt.

d) 2(4(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

45

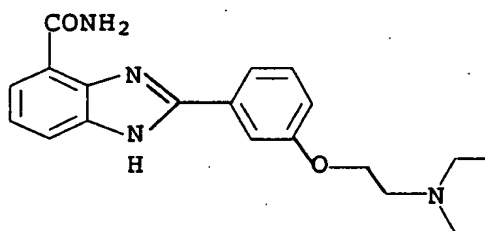
Zu 1,6 g (4,5 mMol) der Zwischenverbindung aus Stufe c in 45 ml Dimethylformamid/Wasser (2/1) wurden ca. 1,6 g Raney-Nickel gegeben und alles für 6 Stunden auf 100 °C erwärmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat mit viel Wasser verdünnt, wobei das Produkt ausfiel. Man erhielt 1,2 g des Produktes.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_6\text{-DMSO}$) δ = 0,95 (6H), 2,6 (4H), 2,8 (2H), 4,1 (2H), 7,1 (2H), 7,3 (1H), 7,7 (1H + NH), 7,85 (1H), 8,2 (2H) und 9,4 (NH) ppm.

Beispiel 9: Herstellung des PARP-Inhibitors 2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

15

20



25 a) 3(2-(N,N-Diethylaminoeth-1-yloxy)-benzaldehyd

6,1 g (50mMol) 3-Hydroxybenzaldehyd wurden in 100 ml Ethanol gelöst und 3,5 g (50 mMol) Natriumethanolat wurden zugegeben. Man rührte alles 15 Minuten. Danach wurden 7,5 g (55 mMol) N(2-Chlorethyl)-N,N-diethylamin zugefügt und alles 12 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde danach zwischen Ether und 1N Natronlauge verteilt, die Ether-Phase abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Man erhielt 7,6 g des Zwischenproduktes.

b) 2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureethylester

1 g (5,5 mMol) 2,3 Diaminobenzoesäureethylester und 0,68 ml konzentrierte Essigsäure wurden in 20 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 1,6 g (7,2 mMol) der Zwischenverbindung aus Stufe a, gelöst in 30 ml Methanol, innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Danach wurden 1,1 g (5,5 mMol) Kupfer-II-acetat, gelöst in 19 ml warmem Wasser, zügig zugetropft und anschließend alles 20 Minuten unter Rückfluß gekocht. Man kühlte die Reaktionslösung auf 50 °C und gab 2,25 ml 32 %iger Salzsäure

zu. Danach tropfte man noch vorsichtig eine Lösung aus 2,13 g Natriumsulfid-Hydrat in 15 ml Wasser zu und rührte alles noch 15 Minuten. Die Reaktionslösung wurde auf Eiswasser gegossen und der anfallende Niederschlag abgesaugt. Das Filtrat wurde mit wäßriger Natriumhydrogenkarbonat-Lösung alkalisch gestellt und mehrmals mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt 2,4 g des Zwischenproduktes.

10 c) 2(3(2-(N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäurehydrazid

Zu 2,3 g (6,0 mMol) der Zwischenverbindung aus Stufe b in 30 ml Butanol wurden 1,5 g (30 mMol) Hydrazinhydrat gegeben und alles 10 Stunden auf 120 °C erwärmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Essigester extrahiert. Die Essigester-Phase wurde abgetrennt, getrocknet und im Vakuum eingengt. Man erhielt 1,7 g der Zwischenverbindung.

20 d) 2(3(2-N,N-Diethylamino)eth-1-yloxy)phenyl)-benzimidazol-4-carbonsäureamid

Zu 1 g (2,7 mMol) der Zwischenverbindung aus Stufe c in 30 ml Dimethylformamid/Wasser (2/1) wurden ca. 1,5 g Raney-Nickel gegeben und alles 6 Stunden auf 100 °C erwärmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat mit viel Wasser verdünnt, wobei das Produkt ausfiel. Man erhielt 0,74 g des Produktes.

¹H-NMR (D₆-DMSO) δ = 1,0 (6H), 2,6 (4H), 2,9 (2H), 4,15 (2H), 7,1 (1H), 7,4 (1H), 7,5 (1H), 7,7-7,9 (5H) und 9,3 (NH) ppm.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 67065

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Neue Poly-ADP-Ribose-Polymerase Gene

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 10

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1843 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(F) GEWEBETYP: Brain

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 3..1715
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Poly ADP Ribose Polymerase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GCG GCG CGG CGG CGA CGG AGC ACC GGC GGC GGC AGG GCG AGA	47
Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg	
1 5 10 15	
GCA TTA AAT GAA AGC AAA AGA GTT AAT AAT GGC AAC ACG GCT CCA GAA	95
Ala Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu	
20 25 30	
GAC TCT TCC CCT GCC AAG AAA ACT CGT AGA TGC CAG AGA CAG GAG TCG	143
Asp Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser	
35 40 45	
AAA AAG ATG CCT GTG GCT GGA GGA AAA GCT AAT AAG GAC AGG ACA GAA	191
Lys Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu	
50 55 60	

GAC AAG CAA GAT GAA TCT GTG AAG GCC TTG CTG TTA AAG GGC AAA GCT Asp Lys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala 65 70 75	239
CCT GTG GAC CCA GAG TGT ACA GCC AAG GTG GGG AAG GCT CAT GTG TAT Pro Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr 80 85 90 95	287
TGT GAA GGA AAT GAT GTC TAT GAT GTC ATG CTA AAT CAG ACC AAT CTC Cys Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu 100 105 110	335
CAG TTC AAC AAC AAC AAG TAC TAT CTG ATT CAG CTA TTA GAA GAT GAT Gln Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp 115 120 125	383
GCC CAG AGG AAC TTC AGT GTT TGG ATG AGA TGG GGC CGA GTT GGG AAA Ala Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys 130 135 140	431
ATG GGA CAG CAC AGC CTG GTG GCT TGT TCA GGC AAT CTC AAC AAG GCC Met Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala 145 150 155	479
AG GAA ATC TTT CAG AAG AAA TTC CTT GAC AAA ACG AAA AAC AAT TGG As Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp 160 165 170 175	527
GAA GAT CGA GAA AAG TTT GAG AAG GTG CCT GGA AAA TAT GAT ATG CTA Glu Asp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu 180 185 190	575
CAG ATG GAC TAT GCC ACC AAT ACT CAG GAT GAA GAG GAA ACA AAG AAA Gln Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys 195 200 205	623
GAG GAA TCT CTT AAA TCT CCC TTG AAG CCA GAG TCA CAG CTA GAT CTT Glu Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu 210 215 220	671
CGG GTA CAG GAG TTA ATA AAG TTG ATC TGT AAT GTT CAG GCC ATG GAA Arg Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu 225 230 235	719
GAA ATG ATG ATG GAA ATG AAG TAT AAT ACC AAG AAA GCC CCA CTT GGG Glu Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly 240 245 250 255	767
G CTG ACA GTG GCA CAA ATC AAG GCA GGT TAC CAG TCT CTT AAG AAG Lys Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys 260 265 270	815
ATT GAG GAT TGT ATT CGG GCT GGC CAG CAT GGA CGA GCT CTC ATG GAA Ile Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu 275 280 285	863
GCA TGC AAT GAA TTC TAC ACC AGG ATT CCG CAT GAC TTT GGA CTC CGT Ala Cys Asn Glu Phe Tyr Thr Arg Ile Pro His Asp Phe Gly Leu Arg 290 295 300	911
ACT CCT CCA CTA ATC CGG ACA CAG AAG GAA CTG TCA GAA AAA ATA CAA Thr Pro Pro Leu Ile Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ser Glu Lys Ile Gln 305 310 315	959
TTA CTA GAG GCT TTG GGA GAC ATT GAA ATT GCT ATT AAG CTG GTG AAA	1007

Leu	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala	Ile	Lys	Leu	Val	Lys
320					325					330					335
ACA	GAG	CTA	CAA	AGC	CCA	GAA	CAC	CCA	TTG	GAC	CAA	CAC	TAT	AGA	AAC
Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	His	Pro	Leu	Asp	Gln	His	Tyr	Arg	Asn
				340					345					350	
CTA	CAT	TGT	GCC	TTG	CGC	CCC	CTT	GAC	CAT	GAA	AGT	TAC	GAG	TTC	AAA
Leu	His	Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Asp	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Phe	Lys
			355					360					365		
GTG	ATT	TCC	CAG	TAC	CTA	CAA	TCT	ACC	CAT	GCT	CCC	ACA	CAC	AGC	GAC
Val	Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser	Thr	His	Ala	Pro	Thr	His	Ser	Asp
		370					375					380			
TAT	ACC	ATG	ACC	TTG	CTG	GAT	TTG	TTT	GAA	GTG	GAG	AAG	GAT	GGT	GAG
Tyr	Thr	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Asp	Gly	Glu
	385					390					395				
AAA	GAA	GCC	TTC	AGA	GAG	GAC	CTT	CAT	AAC	AGG	ATG	CTT	CTA	TGG	CAT
Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	His	Asn	Arg	Met	Leu	Leu	Trp	His
400					405					410					415
GGT	TCC	AGG	ATG	AGT	AAC	TGG	GTG	GGA	ATC	TTG	AGC	CAT	GGG	CTT	CGA
Gly	Ser	Arg	Met	Ser	Asn	Trp	Val	Gly	Ile	Leu	Ser	His	Gly	Leu	Arg
				420				425						430	
ATT	GCC	CCA	CCT	GAA	GCT	CCC	ATC	ACA	GGT	TAC	ATG	TTT	GGG	AAA	GGA
Ile	Ala	Pro	Pro	Glu	Ala	Pro	Ile	Thr	Gly	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Gly
			435					440					445		
ATC	TAC	TTT	GCT	GAC	ATG	TCT	TCC	AAG	AGT	GCC	AAT	TAC	TGC	TTT	GCC
Ile	Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ala
		450					455					460			
TCT	CGC	CTA	AAG	AAT	ACA	GGA	CTG	CTG	CTC	TTA	TCA	GAG	GTA	GCT	CTA
Ser	Arg	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Glu	Val	Ala	Leu
	465					470					475				
GGT	CAG	TGT	AAT	GAA	CTA	CTA	GAG	GCC	AAT	CCT	AAG	GCC	GAA	GGA	TTG
Gly	Gln	Cys	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Asn	Pro	Lys	Ala	Glu	Gly	Leu
480				485						490					495
CTT	CAA	GGT	AAA	CAT	AGC	ACC	AAG	GGG	CTG	GGC	AAG	ATG	GCT	CCC	AGT
Leu	Gln	Gly	Lys	His	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Gly	Lys	Met	Ala	Pro	Ser
				500				505						510	
TTT	GCC	CAC	TTC	GTC	ACC	CTG	AAT	GGG	AGT	ACA	GTG	CCA	TTA	GGA	CCA
Trp	Ala	His	Phe	Val	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Pro	Leu	Gly	Pro
			515					520					525		
GCA	AGT	GAC	ACA	GGA	ATT	CTG	AAT	CCA	GAT	GGT	TAT	ACC	CTC	AAC	TAC
Ala	Ser	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Tyr
		530					535					540			
AAT	GAA	TAT	ATT	GTA	TAT	AAC	CCC	AAC	CAG	GTC	CGT				

TTGTGATATT TTATGTAATA AAAACTGTAC AGGTCTAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

1843

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 571 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Thr Gly Gly Gly Arg Ala Arg Ala
 1 5 10 15

Leu Asn Glu Ser Lys Arg Val Asn Asn Gly Asn Thr Ala Pro Glu Asp
 20 25 30

Ser Ser Pro Ala Lys Lys Thr Arg Arg Cys Gln Arg Gln Glu Ser Lys
 35 40 45

Lys Met Pro Val Ala Gly Gly Lys Ala Asn Lys Asp Arg Thr Glu Asp
 50 55 60

ys Gln Asp Glu Ser Val Lys Ala Leu Leu Leu Lys Gly Lys Ala Pro
 65 70 75 80

Val Asp Pro Glu Cys Thr Ala Lys Val Gly Lys Ala His Val Tyr Cys
 85 90 95

Glu Gly Asn Asp Val Tyr Asp Val Met Leu Asn Gln Thr Asn Leu Gln
 100 105 110

Phe Asn Asn Asn Lys Tyr Tyr Leu Ile Gln Leu Leu Glu Asp Asp Ala
 115 120 125

Gln Arg Asn Phe Ser Val Trp Met Arg Trp Gly Arg Val Gly Lys Met
 130 135 140

Gly Gln His Ser Leu Val Ala Cys Ser Gly Asn Leu Asn Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Glu Ile Phe Gln Lys Lys Phe Leu Asp Lys Thr Lys Asn Asn Trp Glu
 165 170 175

sp Arg Glu Lys Phe Glu Lys Val Pro Gly Lys Tyr Asp Met Leu Gln
 180 185 190

Met Asp Tyr Ala Thr Asn Thr Gln Asp Glu Glu Glu Thr Lys Lys Glu
 195 200 205

Glu Ser Leu Lys Ser Pro Leu Lys Pro Glu Ser Gln Leu Asp Leu Arg
 210 215 220

Val Gln Glu Leu Ile Lys Leu Ile Cys Asn Val Gln Ala Met Glu Glu
 225 230 235 240

Met Met Met Glu Met Lys Tyr Asn Thr Lys Lys Ala Pro Leu Gly Lys
 245 250 255

Leu Thr Val Ala Gln Ile Lys Ala Gly Tyr Gln Ser Leu Lys Lys Ile
 260 265 270

Glu Asp Cys Ile Arg Ala Gly Gln His Gly Arg Ala Leu Met Glu Ala

11 2008.09

275					280					285					
Cys	Asn	Glu	Phe	Tyr	Thr	Arg	Ile	Pro	His	Asp	Phe	Gly	Leu	Arg	Thr
290						295					300				
Pro	Pro	Leu	Ile	Arg	Thr	Gln	Lys	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Ile	Gln	Leu
305					310					315					320
Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Asp	Ile	Glu	Ile	Ala	Ile	Lys	Leu	Val	Lys	Thr
				325					330					335	
Glu	Leu	Gln	Ser	Pro	Glu	His	Pro	Leu	Asp	Gln	His	Tyr	Arg	Asn	Leu
			340					345					350		
His	Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Asp	His	Glu	Ser	Tyr	Glu	Phe	Lys	Val
		355					360					365			
Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ser	Thr	His	Ala	Pro	Thr	His	Ser	Asp	Tyr
	370					375					380				
Thr	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Phe	Glu	Val	Glu	Lys	Asp	Gly	Glu	Lys
385					390					395				400	
Glu	Ala	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	His	Asn	Arg	Met	Leu	Leu	Trp	His	Gly
				405					410					415	
Ser	Arg	Met	Ser	Asn	Trp	Val	Gly	Ile	Leu	Ser	His	Gly	Leu	Arg	Ile
			420					425					430		
Ala	Pro	Pro	Glu	Ala	Pro	Ile	Thr	Gly	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Gly	Ile
			435				440					445			
Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Ser	Ser	Lys	Ser	Ala	Asn	Tyr	Cys	Phe	Ala	Ser
	450					455					460				
Arg	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	Gly
465					470					475					480
Gln	Cys	Asn	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Asn	Pro	Lys	Ala	Glu	Gly	Leu	Leu
			485					490						495	
Gln	Gly	Lys	His	Ser	Thr	Lys	Gly	Leu	Gly	Lys	Met	Ala	Pro	Ser	Ser
			500					505					510		
Ala	His	Phe	Val	Thr	Leu	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala
			515				520					525			
r	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Leu	Asn	Tyr	Asn
	530					535					540				
Glu	Tyr	Ile	Val	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gln	Val	Arg	Met	Arg	Tyr	Leu	Leu
545					550					555					560
Lys	Val	Gln	Phe	Asn	Phe	Leu	Gln	Leu	Trp	*					
			565						570						

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2265 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(F) GEWEBETYP: Uterus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 242..1843

(D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Poly ADP Ribose
Polymerase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TGGGACTGGT CGCCTGACTC GGCCTGCCCC AGCCTCTGCT TCACCCCACT GGTGGCCAAA	60
TAGCCGATGT CTAATCCCC ACACAAGCTC ATCCCCGGCC TCTGGGATTG TTGGGAATTC	120
TCTCCCTAAT TCACGCCTGA GGCTCATGGA GAGTTGCTAG ACCTGGGACT GCCCTGGGAG	180
GCGCACACAA CCAGGCCGGG TGGCAGCCAG GACCTCTCCC ATGTCCCTGC TTTTCTTGGC	240
ATG GCT CCA AAG CCG AAG CCC TGG GTA CAG ACT GAG GGC CCT GAG	286
Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro Glu	
575 580 585	
AAG AAG AAG GGC CGG CAG GCA GGA AGG GAG GAG GAC CCC TTC CGC TCC	334
Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg Ser	
590 595 600	
ACC GCT GAG GCC CTC AAG GCC ATA CCC GCA GAG AAG CGC ATA ATC CGC	382
Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile Arg	
605 610 615	
GTG GAT CCA ACA TGT CCA CTC AGC AGC AAC CCC GGG ACC CAG GTG TAT	430
Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val Tyr	
620 625 630	
GAG GAC TAC AAC TGC ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GAG AAC AAC AAC	478
Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn Asn	
635 640 645 650	
AAC AAG TTC TAC ATC ATC CAG CTG CTC CAA GAC AGC AAC CGC TTC TTC	526
Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe Phe	
655 660 665	
ACC TGC TGG AAC CGC TGG GGC CGT GTG GGA GAG GTC GGC CAG TCA AAG	574
Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys	
670 675 680	
ATC AAC CAC TTC ACA AGG CTA GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT GAG AAG	622
Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu Lys	
685 690 695	
AAA TTT CGG GAA AAG ACC AAG AAC AAC TGG GCA GAG CGG GAC CAC TTT	670
Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His Phe	
700 705 710	
GTG TCT CAC CCG GGC AAG TAC ACA CTT ATC GAA GTA CAG GCA GAG GAT	718
Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu Asp	
715 720 725 730	
GAG GCC CAG GAA GCT GTG GTG AAG GTG GAC AGA GGC CCA GTG AGG ACT	766

Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp	Arg	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	
				735					740					745		
GTG	ACT	AAG	CGG	GTG	CAG	CCC	TGC	TCC	CTG	GAC	CCA	GCC	ACG	CAG	AAG	814
Val	Thr	Lys	Arg	Val	Gln	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Lys	
			750					755					760			
CTC	ATC	ACT	AAC	ATC	TTC	AGC	AAG	GAG	ATG	TTC	AAG	AAC	ACC	ATG	GCC	862
Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Thr	Met	Ala	
		765					770					775				
CTC	ATG	GAC	CTG	GAT	GTG	AAG	AAG	ATG	CCC	CTG	GGA	AAG	CTG	AGC	AAG	910
Leu	Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Lys	
	780					785					790					
CAA	CAG	ATT	GCA	CGG	GGT	TTC	GAG	GCC	TTG	GAG	GCG	CTG	GAG	GAG	GCC	958
Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	
795					800					805					810	
CTG	AAA	GGC	CCC	ACG	GAT	GGT	GGC	CAA	AGC	CTG	GAG	GAG	CTG	TCC	TCA	1006
Leu	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	
				815					820					825		
CAC	TTT	TAC	ACC	GTC	ATC	CCG	CAC	AAC	TTC	GGC	CAC	AGC	CAG	CCC	CCG	1054
His	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Pro	
			830					835					840			
CCC	ATC	AAT	TCC	CCT	GAG	CTT	CTG	CAG	GCC	AAG	AAG	GAC	ATG	CTG	CTG	1102
Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	
		845					850					855				
GTG	CTG	GCG	GAC	ATC	GAG	CTG	GCC	CAG	GCC	CTG	CAG	GCA	GTC	TCT	GAG	1150
Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Glu	
	860					865					870					
CAG	GAG	AAG	ACG	GTG	GAG	GAG	GTG	CCA	CAC	CCC	CTG	GAC	CGA	GAC	TAC	1198
Gln	Glu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	
875					880					885					890	
CAG	CTT	CTC	AAG	TGC	CAG	CTG	CAG	CTG	CTA	GAC	TCT	GGA	GCA	CCT	GAG	1246
Gln	Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Glu	
				895					900					905		
TAC	AAG	GTG	ATA	CAG	ACC	TAC	TTA	GAA	CAG	ACT	GGC	AGC	AAC	CAC	AGG	1294
Tyr	Lys	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ser	Asn	His	Arg	
			910					915					920			
CC	CCT	ACA	CTT	CAA	CAC	ATC	TGG	AAA	GTA	AAC	CAA	GAA	GGG	GAG	GAA	1342
Lys	Pro	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Trp	Lys	Val	Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	Glu	
		925					930					935				
GAC	AGA	TTC	CAG	GCC	CAC	TCC	AAA	CTG	GGT	AAT	CGG	AAG	CTG	CTG	TGG	1390
Asp	Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Trp	
	940					945					950					
CAT	GGC	ACC	AAC	ATG	GCC	GTG	GTG	GCC	GCC	ATC	CTC	ACT	AGT	GGG	CTC	1438
His	Gly	Thr	Asn	Met	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	
955					960					965					970	
CGC	ATC	ATG	CCA	CAT	TCT	GGT	GGG	CGT	GTT	GGC	AAG	GGC	ATC	TAC	TTT	1486
Arg	Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	
				975					980					985		
GCC	TCA	GAG	AAC	AGC	AAG	TCA	GCT	GGA	TAT	GTT	ATT	GGC	ATG	AAG	TGT	1534
Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Ile	Gly	Met	Lys	Cys	

990	995	1000	
GGG GCC CAC CAT GTC GGC TAC ATG TTC CTG GGT GAG GTG GCC CTG GGC			1582
Gly Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly			
1005	1010	1015	
AGA GAG CAC CAT ATC AAC ACG GAC AAC CCC AGC TTG AAG AGC CCA CCT			1630
Arg Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro			
1020	1025	1030	
CCT GGC TTC GAC AGT GTC ATT GCC CGA GGC CAC ACC GAG CCT GAT CCG			1678
Pro Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro			
1035	1040	1045	1050
ACC CAG GAC ACT GAG TTG GAG CTG GAT GGC CAG CAA GTG GTG GTG CCC			1726
Thr Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro			
1055	1060	1065	
CAG GGC CAG CCT GTG CCC TGC CCA GAG TTC AGC AGC TCC ACA TTC TCC			1774
Gln Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser			
1070	1075	1080	
CAG AGC GAG TAC CTC ATC TAC CAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC			1822
ln Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr			
1085	1090	1095	
CTG CTG GAG GTC CAC CTC TGA GTGCCCCGCC TGTCCCCCGG GGTCTTGCAA			1873
Leu Leu Glu Val His Leu *			
1100	1105		
GGCTGGACTG TGATCTTCAA TCATCCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTTT			1933
TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA			1993
CTTATGCCTC CTAAGTGAAT TTTTGTATTC TTTGACACAT CTGCCCAGTC CCTCTCCTCC			2053
CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTTT ACTTGTATAA GGGCAGCTTT TATAGGTTCC			2113
ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTGTTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATTT CACTCAGCAT			2173
AATGTGCACC GGGTTCACCC ATGTTTTTCAT AAATGACAAG ATTTCTCTCT TTAACAAAAA			2233
AAAAACAAAAA AAAAAACAAAAA AAAAAACAAAAA AA			2265

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 534 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Ala	Pro	Lys	Pro	Lys	Pro	Trp	Val	Gln	Thr	Glu	Gly	Pro	Glu	Lys
1				5					10					15	
Lys	Lys	Gly	Arg	Gln	Ala	Gly	Arg	Glu	Asp	Pro	Phe	Arg	Ser	Thr	
		20					25					30			
Ala	Glu	Ala	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Ala	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Arg	Val
		35					40					45			
Asp	Pro	Thr	Cys	Pro	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Glu

M 2008.99

50

55

60

Asp 65	Tyr	Asn	Cys	Thr	Leu 70	Asn	Gln	Thr	Asn	Ile 75	Glu	Asn	Asn	Asn	Asn 80
Lys	Phe	Tyr	Ile	Ile 85	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp 90	Ser	Asn	Arg	Phe	Phe	Thr
Cys	Trp	Asn	Arg	Trp	Gly	Arg	Val	Gly 105	Glu	Val	Gly	Gln	Ser	Lys	Ile
Asn	His	Phe	Thr	Arg	Leu	Glu	Asp	Ala 120	Lys	Lys	Asp	Phe	Glu	Lys	Lys
Phe	Arg	Glu	Lys	Thr	Lys	Asn	Asn	Trp	Ala	Glu	Arg	Asp	His	Phe	Val
Ser	His	Pro	Gly	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu
Ala	Gln	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp	Arg	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	Val
Thr	Lys	Arg	Val	Gln	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Lys	Leu
Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Thr	Met	Ala	Leu
Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Lys	Gln
Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu
Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	His
Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	His	Ser	Gln	Pro	Pro	Pro
Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val
Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Glu	Gln
Leu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln
Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Glu	Tyr
Lys	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gln	Thr	Gly	Ser	Asn	His	Arg	Cys
Pro	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Trp	Lys	Val	Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	Glu	Asp
Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Trp	His
Gly	Thr	Asn	Met	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg

M 29.05.99

Ile Met Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala
 405 410 415

Ser Glu Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Ile Gly Met Lys Cys Gly
 420 425 430

Ala His His Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Arg
 435 440 445

Glu His His Ile Asn Thr Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460

Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly His Thr Glu Pro Asp Pro Thr
 465 470 475 480

Gln Asp Thr Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Gln Val Val Val Pro Gln
 485 490 495

Gly Gln Pro Val Pro Cys Pro Glu Phe Ser Ser Ser Thr Phe Ser Gln
 500 505 510

Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Gln Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
 515 520 525

Leu Glu Val His Leu *

530

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2265 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (F) GEWEBETYP: Uterus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 221..1843
- (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Poly ADP Ribose Polymerase"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TGGGACTGGT CGCCTGACTC GGCCTGCCCC AGCCTCTGCT TCACCCCACT GGTGGCCAAA	60
TAGCCGATGT CTAATCCCCC ACACAAGCTC ATCCCCGGCC TCTGGGATTG TTGGGAATTC	120
TCTCCCTAAT TCACGCCTGA GGCTCATGGA GAGTTGCTAG ACCTGGGACT GCCCTGGGAG	180
GCGCACACAA CCAGGCCGGG TGGCAGCCAG GACCTCTCCC ATG TCC CTG CTT TTC	235
Met Ser Leu Leu Phe	
535	
TTG GCC ATG GCT CCA AAG CCG AAG CCC TGG GTA CAG ACT GAG GGC CCT	283
Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val Gln Thr Glu Gly Pro	

11 2005.00

540	545	550	555	
GAG AAG AAG AAG GGC CGG CAG GCA GGA AGG GAG GAG GAC CCC TTC CGC Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu Glu Asp Pro Phe Arg 560 565 570				331
TCC ACC GCT GAG GCC CTC AAG GCC ATA CCC GCA GAG AAG CGC ATA ATC Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala Glu Lys Arg Ile Ile 575 580 585				379
CGC GTG GAT CCA ACA TGT CCA CTC AGC AGC AAC CCC GGG ACC CAG GTG Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn Pro Gly Thr Gln Val 590 595 600				427
TAT GAG GAC TAC AAC TGC ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GAG AAC AAC Tyr Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Glu Asn Asn 605 610 615				475
AAC AAC AAG TTC TAC ATC ATC CAG CTG CTC CAA GAC AGC AAC CGC TTC Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln Asp Ser Asn Arg Phe 620 625 630 635				523
TTC ACC TGC TGG AAC CGC TGG GGC CGT GTG GGA GAG GTC GGC CAG TCA Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser 640 645 650				571
AAG ATC AAC CAC TTC ACA AGG CTA GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT GAG Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Glu 655 660 665				619
AAG AAA TTT CGG GAA AAG ACC AAG AAC AAC TGG GCA GAG CGG GAC CAC Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp Ala Glu Arg Asp His 670 675 680				667
TTT GTG TCT CAC CCG GGC AAG TAC ACA CTT ATC GAA GTA CAG GCA GAG Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Ala Glu 685 690 695				715
GAT GAG GCC CAG GAA GCT GTG GTG AAG GTG GAC AGA GGC CCA GTG AGG Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp Arg Gly Pro Val Arg 700 705 710 715				763
ACT GTG ACT AAG CGG GTG CAG CCC TGC TCC CTG GAC CCA GCC ACG CAG Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln 720 725 730				811
AG CTC ATC ACT AAC ATC TTC AGC AAG GAG ATG TTC AAG AAC ACC ATG s Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met Phe Lys Asn Thr Met 735 740 745				859
GCC CTC ATG GAC CTG GAT GTG AAG AAG ATG CCC CTG GGA AAG CTG AGC Ala Leu Met Asp Leu Asp Val Lys Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Ser 750 755 760				907
AAG CAA CAG ATT GCA CGG GGT TTC GAG GCC TTG GAG GCG CTG GAG GAG Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu 765 770 775				955
GCC CTG AAA GGC CCC ACG GAT GGT GGC CAA AGC CTG GAG GAG CTG TCC Ala Leu Lys Gly Pro Thr Asp Gly Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser 780 785 790 795				1003
TCA CAC TTT TAC ACC GTC ATC CCG CAC AAC TTC GGC CAC AGC CAG CCC Ser His Phe Tyr Thr Val Ile Pro His Asn Phe Gly His Ser Gln Pro 800 805 810				1051

CCG Pro	CCC Pro	ATC Ile	AAT Asn 815	TCC Ser	CCT Pro	GAG Glu	CTT Leu	CTG Leu 820	CAG Gln	GCC Ala	AAG Lys	AAG Lys	ATG Asp 825	CTG Met	1099	
CTG Leu	GTG Val	CTG Leu 830	GCG Ala	GAC Asp	ATC Ile	GAG Glu	CTG Leu 835	GCC Ala	CAG Gln	GCC Ala	CTG Leu	CAG Gln 840	GCA Ala	GTC Val	TCT Ser	1147
GAG Glu	CAG Gln 845	GAG Glu	AAG Lys	ACG Thr	GTG Val	GAG Glu 850	GTG Val	CCA Pro	CAC His	CCC Pro 855	CTG Leu	GAC Asp	CGA Arg	GAC Asp	1195	
TAC Tyr 860	CAG Gln	CTT Leu	CTC Leu	AAG Lys	TGC Cys 865	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	CTG Leu	CTA Leu 870	GAC Asp	TCT Ser	GGA Gly	GCA Ala	CCT Pro 875	1243
GAG Glu	TAC Tyr	AAG Lys	GTG Val	ATA Ile 880	CAG Gln	ACC Thr	TAC Tyr	TTA Leu	GAA Glu 885	CAG Gln	ACT Thr	GGC Gly	AGC Ser	AAC Asn 890	CAC His	1291
AGG Arg	TGC Cys	CCT Pro	ACA Thr 895	CTT Leu	CAA Gln	CAC His	ATC Ile	TGG Trp 900	AAA Lys	GTA Val	AAC Asn	CAA Gln	GAA Glu 905	GGG Gly	GAG Glu	1339
GAA Glu	GAC Asp	AGA Arg 910	TTC Phe	CAG Gln	GCC Ala	CAC His	TCC Ser 915	AAA Lys	CTG Leu	GGT Gly	AAT Asn	CGG Arg 920	AAG Lys	CTG Leu	CTG Leu	1387
TGG Trp 925	CAT His	GGC Gly	ACC Thr	AAC Asn	ATG Met	GCC Ala 930	GTG Val	GTG Val	GCC Ala	GCC Ala	ATC Ile 935	CTC Leu	ACT Thr	AGT Ser	GGG Gly	1435
CTC Leu 940	CGC Arg	ATC Ile	ATG Met	CCA Pro	CAT His 945	TCT Ser	GGT Gly	GGG Gly	CGT Arg	GTT Val 950	GGC Gly	AAG Lys	GGC Gly	ATC Ile	TAC Tyr 955	1483
TTT Phe	GCC Ala	TCA Ser	GAG Glu	AAC Asn 960	AGC Ser	AAG Lys	TCA Ser	GCT Ala	GGA Gly 965	TAT Tyr	GTT Val	ATT Ile	GGC Gly	ATG Met 970	AAG Lys	1531
TGT Cys	GGG Gly	GCC Ala	CAC His 975	CAT His	GTC Val	GGC Gly	TAC Tyr	ATG Met 980	TTC Phe	CTG Leu	GGT Gly	GAG Glu	GTG Val 985	GCC Ala	CTG Leu	1579
GGC Gly	AGA Arg 990	GAG Glu	CAC His	CAT His	ATC Ile	AAC Asn	ACG Thr 995	GAC Asp	AAC Asn	CCC Pro	AGC Ser	TTG Leu 1000	AAG Lys	AGC Ser	CCA Pro	1627
CT Pro 1005	CCT Pro	GGC Gly	TTC Phe	GAC Asp	AGT Ser	GTC Val 1010	ATT Ile	GCC Ala	CGA Arg	GGC Gly	CAC His 1015	ACC Thr	GAG Glu	CCT Pro	GAT Asp	1675
CCG Pro 1020	ACC Thr	CAG Gln	GAC Asp	ACT Thr	GAG Glu 1025	TTG Leu	GAG Glu	CTG Leu	GAT Asp	GGC Gly 1030	CAG Gln	CAA Gln	GTG Val	GTG Val	GTG Val 1035	1723
CCC Pro	CAG Gln	GGC Gly	CAG Gln	CCT Pro 1040	GTG Val	CCC Pro	TGC Cys	CCA Pro	GAG Glu 1045	TTC Phe	AGC Ser	AGC Ser	TCC Ser	ACA Thr 1050	TTC Phe	1771
TCC Ser	CAG Gln	AGC Ser	GAG Glu 1055	TAC Tyr	CTC Leu	ATC Ile	TAC Tyr	CAG Gln 1060	GAG Glu	AGC Ser	CAG Gln	TGT Cys	CGC Arg	CTG Leu	CGC Arg	1819
TAC	CTG	CTG	GAG	GTC	CAC	CTC	TGA	GTG	CCCCGCCC	TGT	CCCCCGG	GGT	CCT	GCAA		1873

11 2005.09

Tyr Leu Leu Glu Val His Leu *
1070 1075

GGCTGGACTG TGATCTTCAA TCATCCTGCC CATCTCTGGT ACCCCTATAT CACTCCTTTT 1933
TTTCAAGAAT ACAATACGTT GTTGTTAACT ATAGTCACCA TGCTGTACAA GATCCCTGAA 1993
CTTATGCCTC CTAAGTGAAG TTTTGTATTC TTTGACACAT CTGCCCAGTC CCTCTCCTCC 2053
CAGCCCATGG TAACCAGCAT TTGACTCTTT ACTTGTATAA GGGCAGCTTT TATAGTTTCC 2113
ACATGTAAGT GAGATCATGC AGTGTTTGTC TTTCTGTGCC TGGCTTATTT CACTCAGCAT 2173
AATGTGCACC GGGTTCACCC ATGTTTTCAT AAATGACAAG ATTCCTCCT TAAAAA AAAA 2233
AAAAA AAAA AAAA AAAA AA 2265

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 541 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ser Leu Leu Phe Leu Ala Met Ala Pro Lys Pro Lys Pro Trp Val
1 5 10 15
Gln Thr Glu Gly Pro Glu Lys Lys Lys Gly Arg Gln Ala Gly Arg Glu
20 25 30
Glu Asp Pro Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu Lys Ala Ile Pro Ala
35 40 45
Glu Lys Arg Ile Ile Arg Val Asp Pro Thr Cys Pro Leu Ser Ser Asn
50 55 60
Pro Gly Thr Gln Val Tyr Glu Asp Tyr Asn Cys Thr Leu Asn Gln Thr
65 70 75 80
Asn Ile Glu Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Gln
85 90 95
Asp Ser Asn Arg Phe Phe Thr Cys Trp Asn Arg Trp Gly Arg Val Gly
100 105 110
Glu Val Gly Gln Ser Lys Ile Asn His Phe Thr Arg Leu Glu Asp Ala
115 120 125
Lys Lys Asp Phe Glu Lys Lys Phe Arg Glu Lys Thr Lys Asn Asn Trp
130 135 140
Ala Glu Arg Asp His Phe Val Ser His Pro Gly Lys Tyr Thr Leu Ile
145 150 155 160
Glu Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Gln Glu Ala Val Val Lys Val Asp
165 170 175
Arg Gly Pro Val Arg Thr Val Thr Lys Arg Val Gln Pro Cys Ser Leu
180 185 190
Asp Pro Ala Thr Gln Lys Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser Lys Glu Met

195					200					205					
Phe	Lys	Asn	Thr	Met	Ala	Leu	Met	Asp	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro
210					215					220					
Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu
225					230					235					240
Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Lys	Gly	Pro	Thr	Asp	Gly	Gly	Gln	Ser
				245					250					255	
Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	His	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe
			260					265					270		
Gly	His	Ser	Gln	Pro	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala
		275					280					285			
Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Ala
		290				295					300				
Leu	Gln	Ala	Val	Ser	Glu	Gln	Glu	Lys	Thr	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His
305					310					315					320
Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	Lys	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu
				325					330					335	
Asp	Ser	Gly	Ala	Pro	Glu	Tyr	Lys	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Glu	Gln
			340					345					350		
Thr	Gly	Ser	Asn	His	Arg	Cys	Pro	Thr	Leu	Gln	His	Ile	Trp	Lys	Val
			355				360					365			
Asn	Gln	Glu	Gly	Glu	Glu	Asp	Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly
			370			375					380				
Asn	Arg	Lys	Leu	Leu	Trp	His	Gly	Thr	Asn	Met	Ala	Val	Val	Ala	Ala
385					390					395					400
Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val
				405					410					415	
Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr
			420					425					430		
Val	Ile	Gly	Met	Lys	Cys	Gly	Ala	His	His	Val	Gly	Tyr	Met	Phe	Leu
			435				440					445			
Glu	Val	Ala	Leu	Gly	Arg	Glu	His	His	Ile	Asn	Thr	Asp	Asn	Pro	
				450		455				460					
Ser	Leu	Lys	Ser	Pro	Pro	Pro	Gly	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Ala	Arg	Gly
465					470					475					480
His	Thr	Glu	Pro	Asp	Pro	Thr	Gln	Asp	Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly
				485					490					495	
Gln	Gln	Val	Val	Val	Pro	Gln	Gly	Gln	Pro	Val	Pro	Cys	Pro	Glu	Phe
				500				505					510		
Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Gln	Ser	Glu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Gln	Glu	Ser
			515				520					525			
Gln	Cys	Arg	Leu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Val	His	Leu	*			
			530			535					540				

14 25.05.99

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1740 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Mus musculus
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 112..1710

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCGGCTTTC ACTTTTCTG CTGCCTCGGG GAACACCTCG AGCCAACCTGC TTCCTAACTC	60
AGGGTGGGCA GAACTGACGG GATCTAAGCT TCTGCATCTC TGAGGAGAAC C ATG GCT	117
	Met Ala
CCA AAA CGA AAG GCC TCT GTG CAG ACT GAG GGC TCC AAG AAG CAG CGA	165
Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys Gln Arg	
545 550 555	
CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG GCT CTC	213
Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu Ala Leu	
560 565 570 575	
AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC TCA TGT	261
Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro Ser Cys	
580 585 590	
CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT GAC TGT	309
Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr Asp Cys	
595 600 605	
CTC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC TAT ATT	357
Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe Tyr Ile	
610 615 620	
ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT CGC TGG	405
Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn Arg Trp	
625 630 635	
GGC CGC GTG GGA GAG GTG GGC CAG AGC AAG ATG AAC CAC TTC ACC TGC	453
Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe Thr Cys	
640 645 650 655	
CTG GAA GAT GCA AAG AAG GAC TTT AAG AAG AAA TTT TGG GAG AAG ACT	501
Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu Lys Thr	
660 665 670	
AAA AAC AAA TGG GAG GAG CGG GAC CGT TTT GTG GCC CAG CCC AAC AAG	549
Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro Asn Lys	
675 680 685	

TAC	ACA	CTT	ATA	GAA	GTC	CAG	GGA	GAA	GCA	GAG	AGC	CAA	GAG	GCT	GTA	597
Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Glu	Ser	Gln	Glu	Ala	Val	
		690					695					700				
GTG	AAG	GCC	TTA	TCT	CCC	CAG	GTG	GAC	AGC	GGC	CCT	GTG	AGG	ACC	GTG	645
Val	Lys	Ala	Leu	Ser	Pro	Gln	Val	Asp	Ser	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	Val	
	705					710					715					
GTC	AAG	CCC	TGC	TCC	CTA	GAC	CCT	GCC	ACC	CAG	AAC	CTT	ATC	ACC	AAC	693
Val	Lys	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	
	720				725					730					735	
ATC	TTC	AGC	AAA	GAG	ATG	TTC	AAG	AAC	GCA	ATG	ACC	CTC	ATG	AAC	CTG	741
Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	
				740					745					750		
GAT	GTG	AAG	AAG	ATG	CCC	TTG	GGA	AAG	CTG	ACC	AAG	CAG	CAG	ATT	GCC	789
Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	
			755					760					765			
CGT	GGC	TTC	GAG	GCC	TTG	GAA	GCT	CTA	GAG	GAG	GCC	ATG	AAA	AAC	CCC	837
Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Lys	Asn	Pro	
		770					775					780				
CA	GGG	GAT	GGC	CAG	AGC	CTG	GAA	GAG	CTC	TCC	TCC	TGC	TTC	TAC	ACT	885
Thr	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Cys	Phe	Tyr	Thr	
	785					790					795					
GTC	ATC	CCA	CAC	AAC	TTC	GGC	CGC	AGC	CGA	CCC	CCG	CCC	ATC	AAC	TCC	933
Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	
	800				805					810					815	
CCT	GAT	GTG	CTT	CAG	GCC	AAG	AAG	GAC	ATG	CTG	CTG	GTG	CTA	GCG	GAC	981
Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	
				820					825					830		
ATC	GAG	TTG	GCG	CAG	ACC	TTG	CAG	GCA	GCC	CCT	GGG	GAG	GAG	GAG	GAG	1029
Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	
			835					840					845			
AAA	GTG	GAA	GAG	GTG	CCA	CAC	CCA	CTG	GAT	CGA	GAC	TAC	CAG	CTC	CTC	1077
Lys	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	
		850					855					860				
AGG	TGC	CAG	CTT	CAA	CTG	CTG	GAC	TCC	GGG	GAG	TCC	GAG	TAC	AAG	GCA	1125
Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ala	
	865					870					875					
CA	CAG	ACC	TAC	CTG	AAA	CAG	ACT	GGC	AAC	AGC	TAC	AGG	TGC	CCA	AAC	1173
Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	Thr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Asn	
	880				885					890					895	
CTG	CGG	CAT	GTT	TGG	AAA	GTG	AAC	CGA	GAA	GGG	GAG	GGA	GAC	AGG	TTC	1221
Leu	Arg	His	Val	Trp	Lys	Val	Asn	Arg	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Arg	Phe	
				900					905					910		
CAG	GCC	CAC	TCC	AAA	CTG	GGC	AAT	CGG	AGG	CTG	CTG	TGG	CAC	GGC	ACC	1269
Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Arg	Leu	Leu	Trp	His	Gly	Thr	
			915					920					925			
AAT	GTG	GCC	GTG	GTG	GCT	GCC	ATC	CTC	ACC	AGT	GGG	CTC	CGA	ATC	ATG	1317
Asn	Val	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg	Ile	Met	
		930					935					940				
CCA	CAC	TCG	GGT	GGT	CGT	GTT	GGC	AAG	GGT	ATT	TAT	TTT	GCC	TCT	GAG	1365

Pro His Ser Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu
 945 950 955

AAC AGC AAG TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC 1413
 Asn Ser Lys Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His
 960 965 970 975

CAG GTG GGC TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC 1461
 Gln Val Gly Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His
 980 985 990

CAC ATC ACC ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT 1509
 His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe
 995 1000 1005

GAC AGC GTC ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC 1557
 Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp
 1010 1015 1020

ATT GAA CTT GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG 1605
 Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro
 1025 1030 1035

CCT GTG CAG TGC CCG TCA TTC AAA AGC TCC AGC TTC AGC CAG AGT GAA 1653
 Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu
 1040 1045 1050 1055

TAC CTC ATA TAC AAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC CTG CTG GAG 1701
 Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu
 1060 1065 1070

ATT CAC CTC TAAGCTGCTT GCCCTCCCTA GGTCCAAGCC 1740
 Ile His Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 533 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys
 1 5 10 15

Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu
 20 25 30

Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro
 35 40 45

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr
 50 55 60

Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe
 65 70 75 80

Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn
 85 90 95

Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe

H

A.08.99

100										105					110				
Thr	Cys	Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Phe	Lys	Lys	Lys	Phe	Trp	Glu				
		115					120					125							
Lys	Thr	Lys	Asn	Lys	Trp	Glu	Glu	Arg	Asp	Arg	Phe	Val	Ala	Gln	Pro				
	130					135						140							
Asn	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Glu	Ser	Gln	Glu				
	145				150					155					160				
Ala	Val	Val	Lys	Ala	Leu	Ser	Pro	Gln	Val	Asp	Ser	Gly	Pro	Val	Arg				
				165					170					175					
Thr	Val	Val	Lys	Pro	Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Ile				
			180					185					190						
Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Met				
		195					200					205							
Asn	Leu	Asp	Val	Lys	Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Gln				
	210					215					220								
Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Lys				
	225				230					235					240				
Asn	Pro	Thr	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Cys	Phe				
				245					250					255					
Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	His	Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Pro	Ile				
			260					265					270						
Asn	Ser	Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu				
		275					280					285							
Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu				
	290					295					300								
Glu	Glu	Lys	Val	Glu	Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln				
	305				310					315					320				
Leu	Leu	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Tyr				
				325					330					335					
Lys	Ala	Ile	Gln	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	Thr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Arg	Cys				
			340					345					350						
Pro	Asn	Leu	Arg	His	Val	Trp	Lys	Val	Asn	Arg	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp				
		355					360					365							
Arg	Phe	Gln	Ala	His	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Arg	Arg	Leu	Leu	Trp	His				
		370				375					380								
Gly	Thr	Asn	Val	Ala	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Arg				
	385				390					395					400				
Ile	Met	Pro	His	Ser	Gly	Gly	Arg	Val	Gly	Lys	Gly	Ile	Tyr	Phe	Ala				
				405					410					415					
Ser	Glu	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Thr	Met	His	Cys	Gly				
			420					425					430						
Gly	His	Gln	Val	Gly	Tyr	Met	Phe	Leu	Gly	Glu	Val	Ala	Leu	Gly	Lys				
		435					440					445							

Glu His His Ile Thr Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro
 450 455 460
 Gly Phe Asp Ser Val Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala
 465 470 475 480
 Gln Asp Ile Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln
 485 490 495
 Gly Pro Pro Val Gln Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln
 500 505 510
 Ser Glu Tyr Leu Ile Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu
 515 520 525
 Leu Glu Ile His Leu
 530

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1587 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1584

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATG GCT CCA AAA CGA AAG GCC TCT GTG CAG ACT GAG GGC TCC AAG AAG	48
Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys	
535 540 545	
AG CGA CAA GGG ACA GAG GAG GAG GAC AGC TTC CGG TCC ACT GCC GAG	96
n Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu	
10 555 560 565	
GCT CTC AGA GCA GCA CCT GCT GAT AAT CGG GTC ATC CGT GTG GAC CCC	144
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro	
570 575 580	
TCA TGT CCA TTC AGC CGG AAC CCC GGG ATA CAG GTC CAC GAG GAC TAT	192
Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr	
585 590 595	
GAC TGT ACC CTG AAC CAG ACC AAC ATC GGC AAC AAC AAC AAC AAG TTC	240
Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Asn Lys Phe	
600 605 610	
TAT ATT ATC CAA CTG CTG GAG GAG GGT AGT CGC TTC TTC TGC TGG AAT	288
Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn	
615 620 625	

CGC	TGG	GGC	CGC	GTG	GGA	GAG	GTG	GGC	CAG	AGC	AAG	ATG	AAC	CAC	TTC	336
Arg	Trp	Gly	Arg	Val	Gly	Glu	Val	Gly	Gln	Ser	Lys	Met	Asn	His	Phe	
630					635					640					645	
ACC	TGC	CTG	GAA	GAT	GCA	AAG	AAG	GAC	TTT	AAG	AAG	AAA	TTT	TGG	GAG	384
Thr	Cys	Leu	Glu	Asp	Ala	Lys	Lys	Asp	Phe	Lys	Lys	Lys	Phe	Trp	Glu	
				650					655					660		
AAG	ACT	AAA	AAC	AAA	TGG	GAG	GAG	CGG	GAC	CGT	TTT	GTG	GCC	CAG	CCC	432
Lys	Thr	Lys	Asn	Lys	Trp	Glu	Glu	Arg	Asp	Arg	Phe	Val	Ala	Gln	Pro	
			665					670					675			
AAC	AAG	TAC	ACA	CTT	ATA	GAA	GTC	CAG	GGA	GAA	GCA	GAG	AGC	CAA	GAG	480
Asn	Lys	Tyr	Thr	Leu	Ile	Glu	Val	Gln	Gly	Glu	Ala	Glu	Ser	Gln	Glu	
		680					685					690				
GCT	GTA	GTG	AAG	GTG	GAC	AGC	GGC	CCT	GTG	AGG	ACC	GTG	GTC	AAG	CCC	528
Ala	Val	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Gly	Pro	Val	Arg	Thr	Val	Val	Lys	Pro	
	695					700					705					
TGC	TCC	CTA	GAC	CCT	GCC	ACC	CAG	AAC	CTT	ATC	ACC	AAC	ATC	TTC	AGC	576
Cys	Ser	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	Ile	Phe	Ser	
710					715					720					725	
AA	GAG	ATG	TTC	AAG	AAC	GCA	ATG	ACC	CTC	ATG	AAC	CTG	GAT	GTG	AAG	624
Lys	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Ala	Met	Thr	Leu	Met	Asn	Leu	Asp	Val	Lys	
				730					735					740		
AAG	ATG	CCC	TTG	GGA	AAG	CTG	ACC	AAG	CAG	CAG	ATT	GCC	CGT	GGC	TTC	672
Lys	Met	Pro	Leu	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	Arg	Gly	Phe	
			745					750				755				
GAG	GCC	TTG	GAA	GCT	CTA	GAG	GAG	GCC	ATG	AAA	AAC	CCC	ACA	GGG	GAT	720
Glu	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Lys	Asn	Pro	Thr	Gly	Asp	
		760					765					770				
GGC	CAG	AGC	CTG	GAA	GAG	CTC	TCC	TCC	TGC	TTC	TAC	ACT	GTC	ATC	CCA	768
Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Cys	Phe	Tyr	Thr	Val	Ile	Pro	
	775					780					785					
CAC	AAC	TTC	GGC	CGC	AGC	CGA	CCC	CCG	CCC	ATC	AAC	TCC	CCT	GAT	GTG	816
His	Asn	Phe	Gly	Arg	Ser	Arg	Pro	Pro	Pro	Ile	Asn	Ser	Pro	Asp	Val	
790					795					800					805	
CTT	CAG	GCC	AAG	AAG	GAC	ATG	CTG	CTG	GTG	CTA	GCG	GAC	ATC	GAG	TTG	864
Leu	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Ile	Glu	Leu	
				810					815					820		
AG	CAG	ACC	TTG	CAG	GCA	GCC	CCT	GGG	GAG	GAG	GAG	GAG	AAA	GTG	GAA	912
Ala	Gln	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Val	Glu	
			825					830					835			
GAG	GTG	CCA	CAC	CCA	CTG	GAT	CGA	GAC	TAC	CAG	CTC	CTC	AGG	TGC	CAG	960
Glu	Val	Pro	His	Pro	Leu	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gln	Leu	Leu	Arg	Cys	Gln	
		840					845					850				
CTT	CAA	CTG	CTG	GAC	TCC	GGG	GAG	TCC	GAG	TAC	AAG	GCA	ATA	CAG	ACC	1008
Leu	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Glu	Tyr	Lys	Ala	Ile	Gln	Thr	
		855				860					865					
TAC	CTG	AAA	CAG	ACT	GGC	AAC	AGC	TAC	AGG	TGC	CCA	AAC	CTG	CGG	CAT	1056
Tyr	Leu	Lys	Gln	Thr	Gly	Asn	Ser	Tyr	Arg	Cys	Pro	Asn	Leu	Arg	His	
870					875					880					885	
GTT	TGG	AAA	GTG	AAC	CGA	GAA	GGG	GAG	GGA	GAC	AGG	TTC	CAG	GCC	CAC	1104

11 2006.00

Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His	
890 895 900	
TCC AAA CTG GGC AAT CGG AGG CTG CTG TGG CAC GGC ACC AAT GTG GCC	1152
Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala	
905 910 915	
GTG GTG GCT GCC ATC CTC ACC AGT GGG CTC CGA ATC ATG CCA CAC TCG	1200
Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser	
920 925 930	
GGT GGT CGT GTT GGC AAG GGT ATT TAT TTT GCC TCT GAG AAC AGC AAG	1248
Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys	
935 940 945	
TCA GCT GGC TAT GTT ACC ACC ATG CAC TGT GGG GGC CAC CAG GTG GGC	1296
Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly	
950 955 960 965	
TAC ATG TTC CTG GGC GAG GTG GCC CTC GGC AAA GAG CAC CAC ATC ACC	1344
Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr	
970 975 980	
ATC GAT GAC CCC AGC TTG AAG AGT CCA CCC CCT GGC TTT GAC AGC GTC	1392
Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val	
985 990 995	
ATC GCC CGA GGC CAA ACC GAG CCG GAT CCC GCC CAG GAC ATT GAA CTT	1440
Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu	
1000 1005 1010	
GAA CTG GAT GGG CAG CCG GTG GTG GTG CCC CAA GGC CCG CCT GTG CAG	1488
Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln	
1015 1020 1025	
TGC CCG TCA TTC AAA AGC TCC AGC TTC AGC CAG AGT GAA TAC CTC ATA	1536
Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile	
1030 1035 1040 1045	
TAC AAG GAG AGC CAG TGT CGC CTG CGC TAC CTG CTG GAG ATT CAC CTC	1584
Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu	
1050 1055 1060	
TAA	1587

) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 528 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ala Ser Val Gln Thr Glu Gly Ser Lys Lys	
1 5 10 15	
Gln Arg Gln Gly Thr Glu Glu Glu Asp Ser Phe Arg Ser Thr Ala Glu	
20 25 30	
Ala Leu Arg Ala Ala Pro Ala Asp Asn Arg Val Ile Arg Val Asp Pro	
35 40 45	

Ser Cys Pro Phe Ser Arg Asn Pro Gly Ile Gln Val His Glu Asp Tyr
 50 55 60
 Asp Cys Thr Leu Asn Gln Thr Asn Ile Gly Asn Asn Asn Lys Phe
 65 70 75 80
 Tyr Ile Ile Gln Leu Leu Glu Glu Gly Ser Arg Phe Phe Cys Trp Asn
 85 90 95
 Arg Trp Gly Arg Val Gly Glu Val Gly Gln Ser Lys Met Asn His Phe
 100 105 110
 Thr Cys Leu Glu Asp Ala Lys Lys Asp Phe Lys Lys Lys Phe Trp Glu
 115 120 125
 Lys Thr Lys Asn Lys Trp Glu Glu Arg Asp Arg Phe Val Ala Gln Pro
 130 135 140
 Asn Lys Tyr Thr Leu Ile Glu Val Gln Gly Glu Ala Glu Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ala Val Val Lys Val Asp Ser Gly Pro Val Arg Thr Val Val Lys Pro
 165 170 175
 As Ser Leu Asp Pro Ala Thr Gln Asn Leu Ile Thr Asn Ile Phe Ser
 180 185 190
 Lys Glu Met Phe Lys Asn Ala Met Thr Leu Met Asn Leu Asp Val Lys
 195 200 205
 Lys Met Pro Leu Gly Lys Leu Thr Lys Gln Gln Ile Ala Arg Gly Phe
 210 215 220
 Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Glu Ala Met Lys Asn Pro Thr Gly Asp
 225 230 235 240
 Gly Gln Ser Leu Glu Glu Leu Ser Ser Cys Phe Tyr Thr Val Ile Pro
 245 250 255
 His Asn Phe Gly Arg Ser Arg Pro Pro Pro Ile Asn Ser Pro Asp Val
 260 265 270
 Leu Gln Ala Lys Lys Asp Met Leu Leu Val Leu Ala Asp Ile Glu Leu
 275 280 285
 Ala Gln Thr Leu Gln Ala Ala Pro Gly Glu Glu Glu Glu Lys Val Glu
 290 295 300
 Leu Val Pro His Pro Leu Asp Arg Asp Tyr Gln Leu Leu Arg Cys Gln
 305 310 315 320
 Leu Gln Leu Leu Asp Ser Gly Glu Ser Glu Tyr Lys Ala Ile Gln Thr
 325 330 335
 Tyr Leu Lys Gln Thr Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Pro Asn Leu Arg His
 340 345 350
 Val Trp Lys Val Asn Arg Glu Gly Glu Gly Asp Arg Phe Gln Ala His
 355 360 365
 Ser Lys Leu Gly Asn Arg Arg Leu Leu Trp His Gly Thr Asn Val Ala
 370 375 380
 Val Val Ala Ala Ile Leu Thr Ser Gly Leu Arg Ile Met Pro His Ser
 385 390 395 400

2005-99

Gly Gly Arg Val Gly Lys Gly Ile Tyr Phe Ala Ser Glu Asn Ser Lys
 405 410 415

Ser Ala Gly Tyr Val Thr Thr Met His Cys Gly Gly His Gln Val Gly
 420 425 430

Tyr Met Phe Leu Gly Glu Val Ala Leu Gly Lys Glu His His Ile Thr
 435 440 445

Ile Asp Asp Pro Ser Leu Lys Ser Pro Pro Pro Gly Phe Asp Ser Val
 450 455 460

Ile Ala Arg Gly Gln Thr Glu Pro Asp Pro Ala Gln Asp Ile Glu Leu
 465 470 475 480

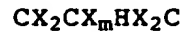
Glu Leu Asp Gly Gln Pro Val Val Val Pro Gln Gly Pro Pro Val Gln
 485 490 495

Cys Pro Ser Phe Lys Ser Ser Ser Phe Ser Gln Ser Glu Tyr Leu Ile
 500 505 510

Tyr Lys Glu Ser Gln Cys Arg Leu Arg Tyr Leu Leu Glu Ile His Leu
 515 520 525

Patentansprüche

1. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-Homologes, gekennzeichnet
5 durch eine Aminosäuresequenz, welche
a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne und
b) kein Zink-Finger-Sequenzmotiv der allgemeinen Formel



10

aufweist, worin

m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und
die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige
Aminosäure stehen;

15

und die funktionalen Äquivalente davon.

2. PARP-Homologes nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
die funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne eines der folgenden all-
gemeinen Sequenzmotive umfaßt:

20

PX_n(S/T)GX₃GKGIYFA,
(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFA oder
LLWHG(S/T)X₇IL(S/T)XGLR(I/V)XPX_n(S/T)GX₃GKGIYFAX₃SKSAXY

25

worin

n für einen ganzzahligen Wert von 1 bis 5 steht und die Reste
X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure ste-
hen.

- 30 3. PARP-Homologes nach einem der vorherigen Ansprüche, umfassend
wenigstens ein weiteres der folgenden Teilsequenz-Motive:

35

LX₉NX₂YX₂QLLX(D/E)X_{10/11}WGRVG,
AX₃FXXK₄KTXNXWX₅FX₃PXK,
QXL(I/L)X₂IX₉MX₁₀PLGKLX₃QIX₆L,
FYTXIPHXFGX₃PP; und
KX₃LX₂LXDIEXAX₂L,

40

worin die Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige
Aminosäure stehen.

4. PARP-Homologes nach einem der vorherigen Ansprüche, ausge-
wählt unter humanen PARP-Homologen, gekennzeichnet durch die
Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2 (humanPARP2) oder SEQ ID
45 NO:4 oder 6 (humanPARP3 Typ 1 bzw. 2); oder murinen PARP-Ho-
mologen, gekennzeichnet durch die Aminosäuresequenz gemäß SEQ

2

ID NO:8 (mausPARP Langform) oder SEQ ID NO:10 (mausPARP Kurzform); und die funktionalen Äquivalente davon.

5. Bindungspartner für PARP-Homologe nach einem der vorherigen Ansprüche, ausgewählt unter
- a) Antikörpern und Fragmenten davon,
 - b) proteinartigen Verbindungen, welche mit einer Teilsequenz des Proteins wechselwirken, und
 - c) niedermolekularen Effektoren, welche die katalytische PARP-Aktivität oder eine andere biologische Funktion eines PARP-Moleküls modulieren.
6. Nukleinsäure, umfassend
- a) eine für wenigstens ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierende Nukleotidsequenz oder die komplementäre Nukleotidsequenz davon;
 - b) eine Nukleotidsequenz, die unter stringenten Bedingungen mit einer Sequenz gemäß a) hybridisiert; oder
 - c) Nukleotidsequenzen, die durch Entartung des genetischen Codes von den in a) und b) definierten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6, umfassend
- a) die Nukleotide + 3 bis + 1715 gemäß SEQ ID NO:1;
 - b) die Nukleotide + 242 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:3;
 - c) die Nukleotide + 221 bis + 1843 gemäß SEQ ID NO:5;
 - d) die Nukleotide + 112 bis + 1710 gemäß SEQ ID NO:7; oder
 - e) die Nukleotide + 1 bis + 1584 gemäß SEQ ID NO:9.
8. Expressionskassette, enthaltend unter genetischer Kontrolle wenigstens einer regulativen Nukleotidsequenz wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 6 und 7.
9. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 8.
10. Rekombinanter Mikroorganismus, enthaltend wenigstens einen rekombinanten Vektor nach Anspruch 9.
11. Transgener Säuger, enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 9.

12. PARP-defizienter Säuger oder PARP-defiziente eukaryontische Zelle, worin eine funktionale Expression wenigstens eines Gens inhibiert ist, das für ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodiert.
- 5
13. In vitro Nachweisverfahren für PARP-Inhibitoren dadurch gekennzeichnet, daß man
- 10
- a) ein ungeträgertes oder geträgertes Poly-ADP-ribosylierbares Target mit einem Reaktionsgemisch inkubiert, umfassend
- a1) ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
- a2) einen PARP-Aktivator; und
- 15
- a3) einen PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet;
- b) die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt; und
- c) die Poly-ADP-Ribosylierung des Target qualitativ oder quantitativ bestimmt.
- 20
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass man das PARP-Homologe mit dem PARP-Aktivator und dem PARP-Inhibitor oder einen Analyten, in welchem man wenigstens einen PARP-Inhibitor vermutet, vorinkubiert, bevor man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durchführt.
- 25
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 und 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Poly-ADP-ribosylierbare Target ein Histon-Protein ist.
- 30
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass der PARP-Aktivator aktivierte DNA ist.
- 35
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierungsreaktion durch Zugabe von NAD⁺ startet.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierung des geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt.
- 40
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das nichtgeträgerte Target mit einem Akzeptor-Fluorophor markiert ist.
- 45
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die Poly-ADP-Ribosylierung des nicht geträgerten Target mit Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper bestimmt, der mit einem Do-

nor-Fluorophor markiert ist, das zur Energieübertragung auf das Akzeptor-Fluorophor befähigt ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 und 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Target biotinyliertes Histon ist und das Akzeptor-Fluorophor über Avidin oder Streptavidin daran gekoppelt ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 und 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Anti-Poly-(ADP-ribose)-Antikörper ein Europium-Kryptat als Donor-Fluorophor trägt.
23. In vitro-Screeningverfahren auf Bindungspartner für ein PARP-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a1) wenigstens ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 an einem Träger immobilisiert;
- b1) das immobilisierte PARP-Homologe mit einem Analyten in Kontakt bringt, in welchem man wenigstens einen Bindungspartner vermutet; und
- c1) an das immobilisierte PARP-Homologe gebundene Bestandteile des Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, bestimmt;
- oder
- a2) einen Analyten, welcher wenigstens einen möglichen Bindungspartner für ein PARP-Molekül enthält, an einem Träger immobilisiert;
- b2) den immobilisierten Analyten mit wenigsten einem PARP-Homologen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in Kontakt bringt, für welches man einen Bindungspartner sucht; und
- c2) den immobilisierten Analyten, gegebenenfalls nach einer Inkubationsphase, auf die Bindung des PARP-Homologen untersucht.
24. Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von PARP-Homologe nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierenden Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch
- a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer definierten Menge einer exogenen Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7, Hybridisierung unter stringenten Bedingungen, Bestimmung der hybridisierenden Nukleinsäuren und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard; oder
- b) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Paar von Oligonucleotid-Primern mit Spezifität für ein PARP-Homologes kodierende Nukleinsäure, Amplifizierung der Nu-

kleinsäure, Bestimmung des Amplifikationsprodukts und gegebenenfalls Vergleich mit einem Standard.

25. Verfahren zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung eines PARP-Homologen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, gekennzeichnet durch
- a) Inkubation einer biologischen Probe mit einem für ein PARP-Homologes spezifischen Bindungspartner,
 - b) Nachweis des Bindungspartner/PARP-Komplexes und gegebenenfalls
 - c) Vergleich des Ergebnisses mit einem Standard.
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Bindungspartner ein Antikörper oder ein bindendes Fragment davon ist, der gegebenenfalls eine detektierbare Markierung trägt.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26 zur Diagnostizierung von Energiedefizienz-vermittelten Erkrankungen.
28. Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit vom PARP-Effektoren, dadurch gekennzeichnet daß man
- a) ein PARP-Homologes nach einem der Ansprüche 1 bis 4 mit einem Analyten inkubiert, welcher einen Effektor einer physiologischen oder pathologischen PARP-Aktivität enthält; den Effektor gegebenenfalls wieder abtrennt; und
 - b) die Aktivität des PARP-Homologen, gegebenenfalls nach Zugabe von Substraten oder Cosubstraten, bestimmt.
29. Gentherapeutisches Mittel, dadurch gekennzeichnet, das es in einem gentherapeutisch akzeptablen Träger ein Nukleinsäurekonstrukt enthält, das
- a) eine Antisense-Nukleinsäure gegen eine kodierende Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7; oder
 - b) ein Ribozym gegen eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 und 7 umfasst; oder
 - c) für einen spezifischen PARP-Inhibitor. kodiert.
30. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger wenigstens ein PARP-Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wenigstens einen PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 oder wenigstens eine kodierende Nukleotidsequenz nach Anspruch 6 oder 7.

11

28.10.99

6

31. Verwendung niedermolekularer PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, an deren Entstehung und/oder Verlauf wenigstens ein PARP-Protein oder ein davon abgeleitetes Polypeptid beteiligt sind.

5

32. Verwendung niedermolekularer PARP-Bindungspartner nach Anspruch 5 zur Diagnose oder Therapie von Krankheitszuständen, die durch eine Energiedefizienz vermittelt sind.

10

58/iT/cb

15

20

25

30

35

40

45

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-Homo-

5 loge, gekennzeichnet durch eine Aminosäuresequenz, welche

a) eine funktionale NAD⁺-Bindungsdomäne
und

b) kein Zink-Finger-Sequenzmotiv der allgemeinen Formel



10 aufweist, worin

m für einen ganzzahligen Wert von 28 oder 30 steht und die
Reste X unabhängig voneinander für eine beliebige Aminosäure
stehen;

und die funktionalen Äquivalente davon; dafür kodierende Nuklein-

15 säuren; Antikörper mit Spezifität für die neuen Protein; pharma-
zeutische und gentherapeutische Mittel, welche erfindungsgemäße
Produkte enthalten; Verfahren zur analytischen Bestimmung der er-
findungsgemäßen Proteine und Nukleinsäuren; Verfahren zur Identi-
fizierung von Effektoren oder Bindungspartnern der erfindungsge-

20 mäßen Proteine; neuartige PARP-Effektoren; und Verfahren zur Be-
stimmung der Wirksamkeit solcher Effektoren.

25

30

35

40

45

Majority					
10	20	30	40	50	60
MAESSDKLYRVEYAKSERASCKKCSSESI	PKDSLRLMAIMVQSPMFDGKVP	HWYHFS	CFWKV		humanPARP1
MAAR					humanPARP2
MS					humanPARP3
M					murinePARP
Majority					
70	80	90	100	110	120
GHSIRHPDVEVDGFGFSEL	RWD DQKVKKTA	EAGGV TGGKQDGGIGSKAEKTL	GDFAAEYAKS		humanPARP1
		RRRSTGGRA		RALNE	humanPARP2
					humanPARP3
					murinePARP
Majority					
130	140	150	160	170	180
NRSTCKGCKMEKIEKKGQVR	LSKKMMVDPEKPKQLGMIDRWYHPGCFVKNRREELGFRPEYSA	SQ			humanPARP1
	SKRVNNGNTAPE	DSSPAKKTR			humanPARP2
					humanPARP3
					murinePARP
Majority					
190	200	210	220	230	240
LKGFSLLA	TEDEKALKKQLPGVKSEGGKRRKGD	KVDGVDEVAKKKSKKEKDKDSKLEKALKA			humanPARP1
	QREQSKKMPVAG	GKANKKDRTE	KQD		humanPARP2
					humanPARP3
					murinePARP
Majority					
250	260	270	280	290	300
QNDLIWN	IKDELKKVCSTNDLKE	LLIFNKKQVPSGESAILDRVADGMVF	GALLPCEECSG		humanPARP1
		ESVKALLLKGKAPVDP			humanPARP2
					humanPARP3
					murinePARP

Fig. 1(1)

		Y C - G		A P K R K X W V				Q Majority				
		310		320		330		340		350		360
301		Q L V F K S D A Y Y C T G D V T A W T K C M V K T Q T P N R K E W V T P K E F R E I S Y L K K L K V K K Q D R I F P P E										humanPARP1
88		K V G - - K A H V Y C E G N -										humanPARP2
9		- - - - -				A P K P K P W V						humanPARP3
2		- - - - -				A P K R K A S V						murinePARP
		T E G S - - - - -				- - - - -						Maj rity
		370		380		390		400		410		420
361		T S A S V A A T P P P S T A S A P A A V N S S A S A D K P L S N M K I L T L G K L S R N K D E V K A M I E K L G G K L T										humanPARP1
100		- - - - -										humanPARP2
18		T E G P - - - - -										humanPARP3
11		T E G S - - - - -										murinePARP
		- - - - -				E K K K X R Q X X X E E D X F R S T A E A L - - - - -						Maj rity
		430		440		450		460		470		480
421		G T A N K A S L C I S T K K E V E K M N K K M E E V K E A N I R V V S E D F L Q D V S A S T K S L Q E L F L A H I L S P										humanPARP1
100		- - - - -										humanPARP2
22		- - - - -				E K K K G R Q A G R E E D P F R S T A E A L - - - - -						humanPARP3
15		- - - - -				- - - - -						murinePARP
		- - - - -				K A X P A E X R X I R V D P X C P L S X N P G X Q V X E D - - - - -						Maj rity
		490		500		510		520		530		540
481		W G A E V K A E P V E V A P R G K S G A A L S K K S K G Q V K E E G I N K S E K R M K L T L K G G A A V D P D S G L E										humanPARP1
100		- - - - -										humanPARP2
44		- - - - -				K A I P A E K R I I R V D P T C P L S S N P G T Q V Y E D - - - - -						humanPARP3
35		- - - - -				- - - - -						murinePARP
		- - - - -				R A A P A D N R V I R V D P S C P F S R N P G I Q V H E D - - - - -						Maj rity
		550		560		570		580		590		600
541		H S A H V L E K G G K V F S A T L G L V D I V K G T N S Y Y K L Q L L E D D K E N R Y W I F R S W G R V G T V I G S N K										humanPARP1
100		- - - - -				D V Y D V M L N Q T N L Q P F N N N K Y Y L I Q L L E D D A Q R N F S V W M R W G R V G K M - - - - -						humanPARP2
73		- - - - -				- - - - -						humanPARP3
64		- - - - -				- - - - -						murinePARP

Fig. 1(2)

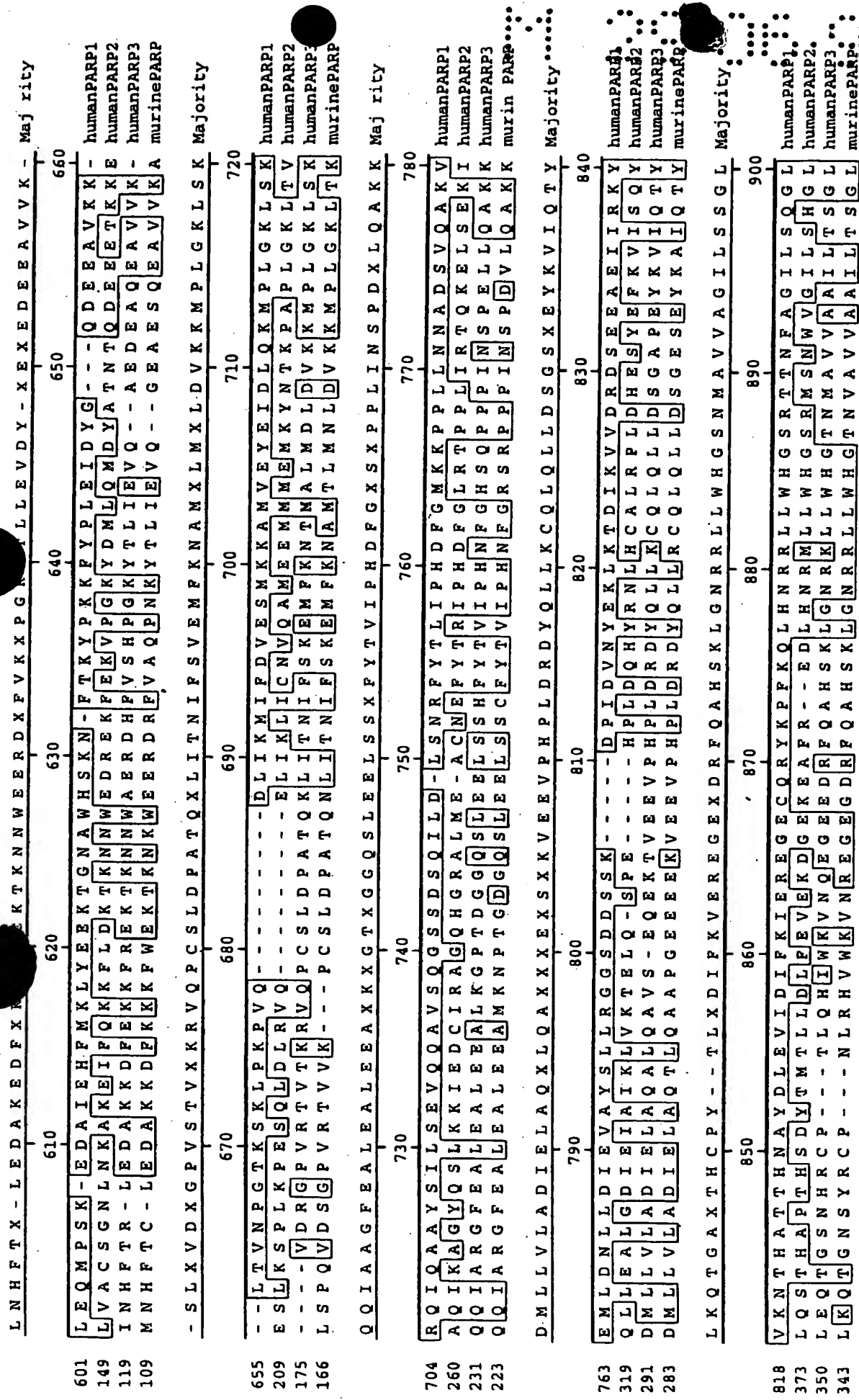


Fig. 1(3)

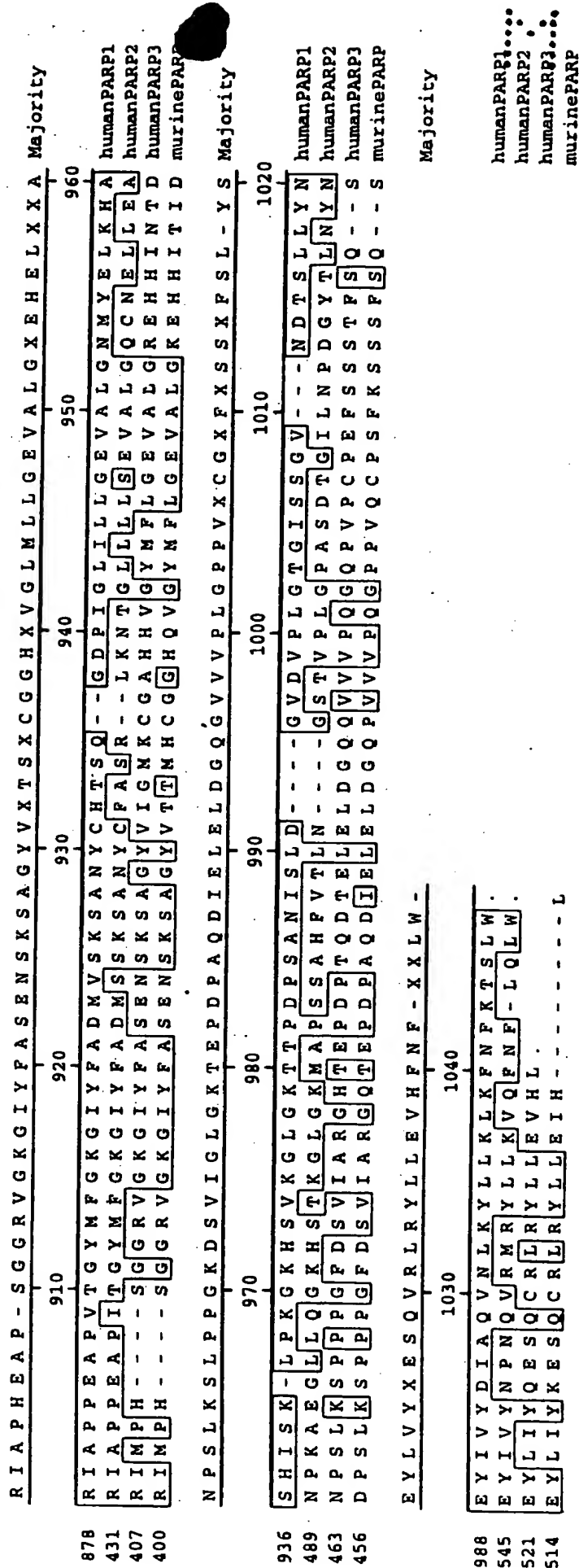
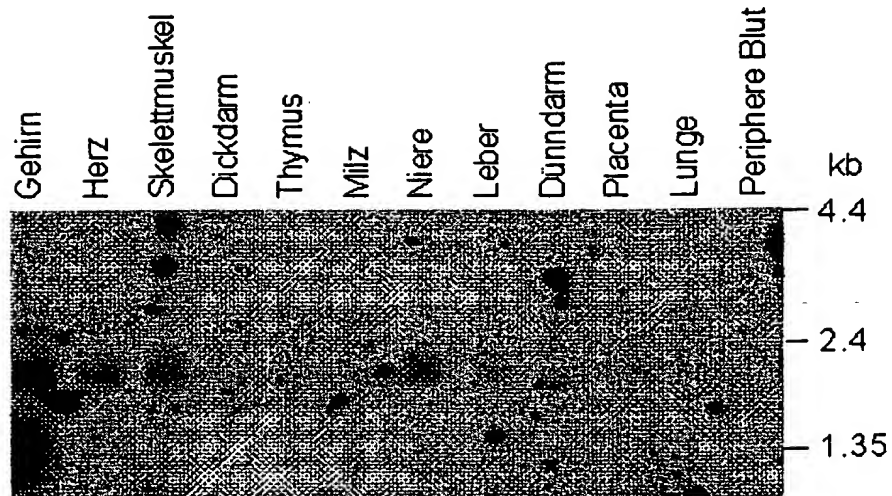


Fig. 1(4)

Ni 20.05.99

hPARP2



hPARP3

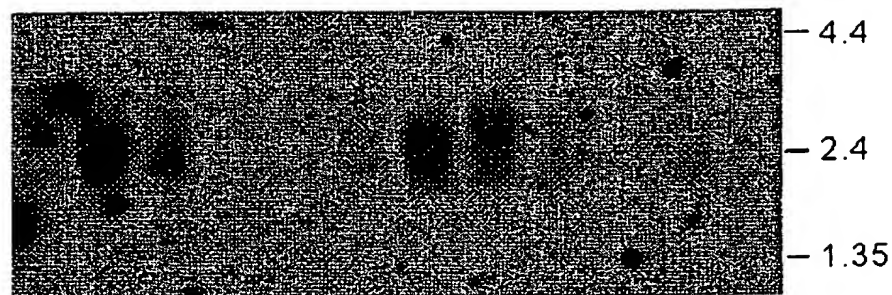


Fig. 2

11 2008.09

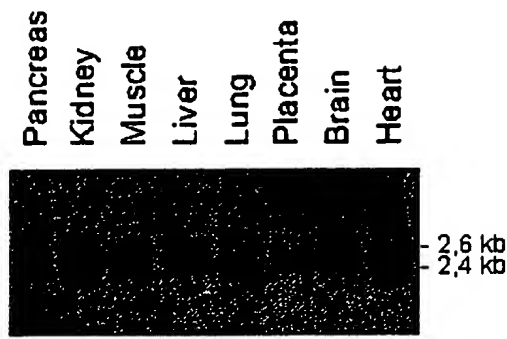


Fig. 3

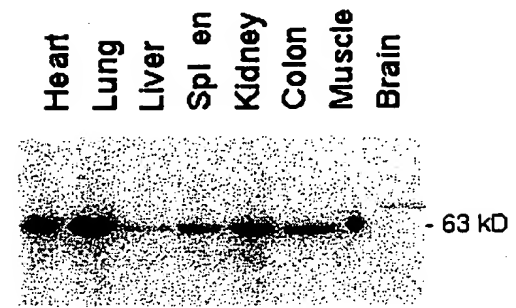


Fig. 4

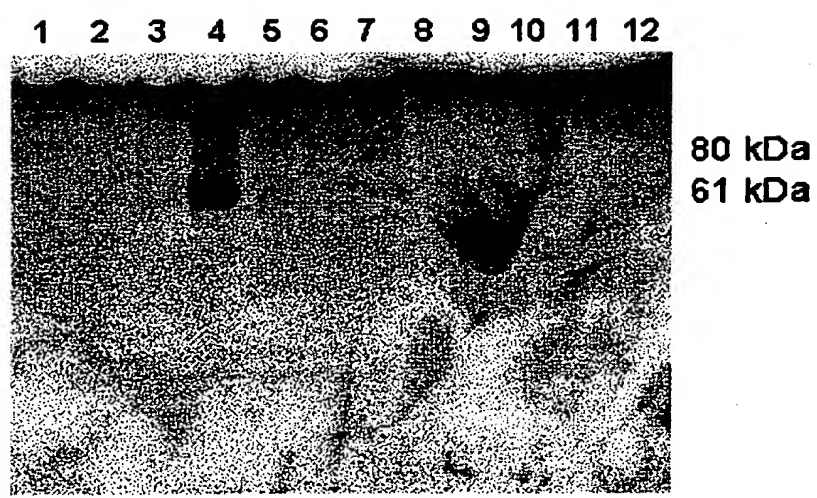


Fig. 5

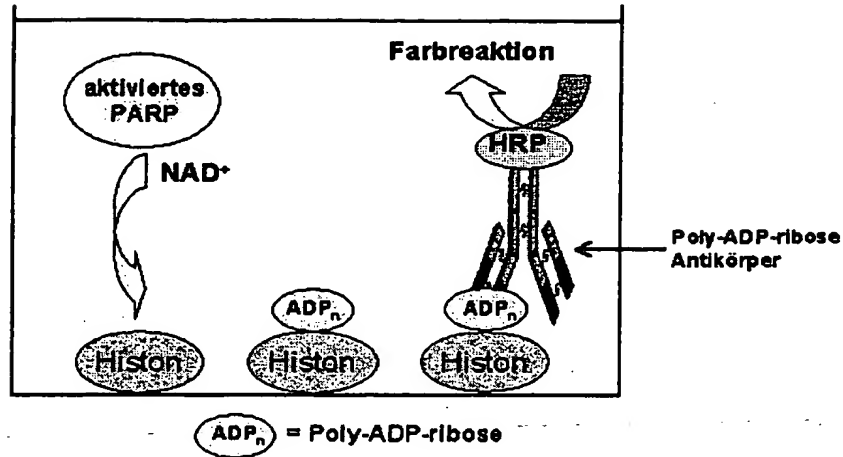


Fig. 6

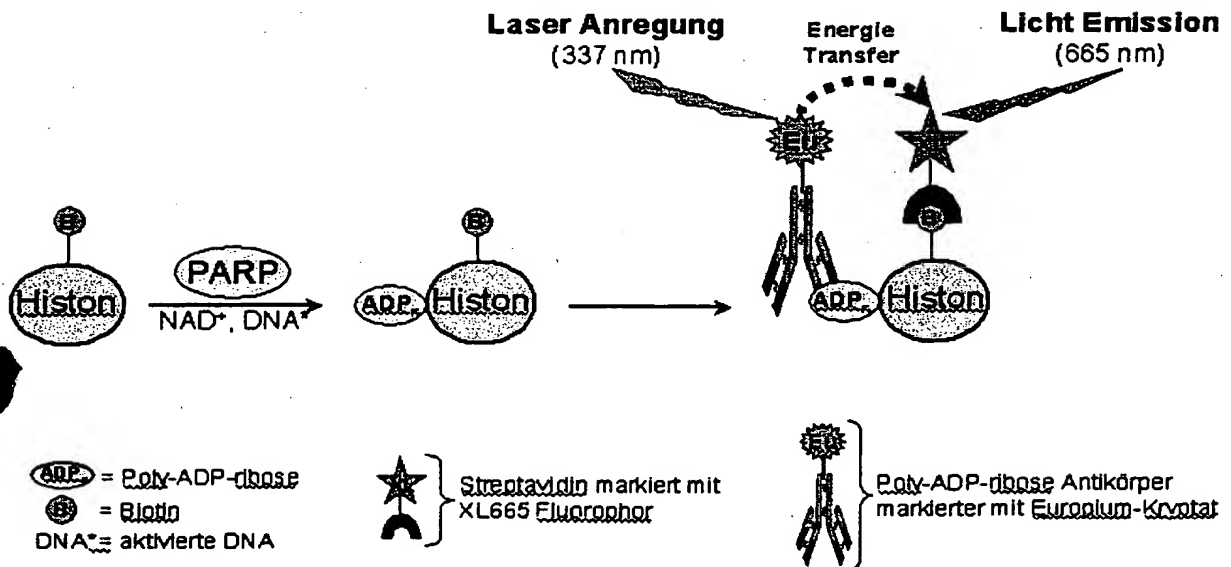


Fig. 7